

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA-UPTC
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN QUÍMICA



**OBTENCIÓN DE ÁCIDO 5-HIDROXIMETIL-2-FURANCARBOXÍLICO
(HMFCA) A PARTIR DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL (5-HMF) CON
MICROORGANISMOS AISLADOS DE BAGAZO DE CAÑA**

Deysi Tatiana Muñoz Castiblanco

Tunja, 2018

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA-UPTC
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN QUÍMICA



**OBTENCIÓN DE ÁCIDO 5-HIDROXIMETIL-2-FURANCARBOXÍLICO
(HMFCA) A PARTIR DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL (5-HMF) CON
MICROORGANISMOS AISLADOS DE BAGAZO DE CAÑA**

**Trabajo de Investigación como requisito parcial para optar al grado de Magíster en
Química**

Deysi Tatiana Muñoz Castiblanco

Director:

Dr.Sc. José Jobanny Martínez Zambrano

Codirector:

Dr.Sc. Hugo Alfonso Rojas Sarmiento

Tunja, 2018

NOTA DE ACEPTACION

Según el acta de sustentación No. _____ del día 6 de noviembre de 2018, la señorita **Deysi Tatiana Muñoz Castiblanco** realizó la sustentación pública de su trabajo de investigación titulado **“Obtención de ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico (HMFCA) a partir de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) con microorganismos aislados de bagazo de caña”**, la cual fue aprobada por la Escuela de Posgrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y teniendo en cuenta el Artículo 36 del Acuerdo 052 de 2012 los jurados designados acordaron asignar una nota final del trabajo de sustentación igual a _____, correspondiente a la escala cualitativa de _____ (Artículo 40 del Acuerdo 052 de 2012).

Para constancia de lo anterior, firman:

Gabriel Patarroyo Moreno
Decano Facultad de Ciencias
Ciencias

Segundo Agustín Martínez Ovalle
Director de Posgrados Facultad de

Gloria Astrid Prieto Suárez
Coordinador Programa de Maestría
en Química

Miriam Andrea Wilches Torres
Jurado 1

Gerardo Andrés Caicedo Pineda
Jurado 2

José Jobanny Martínez Zambrano
Director del Trabajo de Grado

Hugo Alfonso Rojas Sarmiento
Co-director del Trabajo de Grado

Deysi Tatiana Muñoz Castiblanco
Autor

DEDICATORIA

*A Dios, por ser mi guía.
A mi familia y a Felipe, por ser mi apoyo y fortaleza.
Y a todas las personas que hicieron posible este trabajo.*

“La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real.” Max Planck.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme permitido emprender esta nueva etapa en mi vida, por las oportunidades dadas y por ser mi guía y fortaleza.

A mi familia y a Felipe, por el amor y apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo, porque sin ellos no hubiera sido fácil iniciar y finalizar esta nueva etapa en mi vida profesional.

Al profesor José Jobanny Martínez Zambrano, por brindarme la confianza y colaboración en mi formación como investigadora y por su orientación y acompañamiento en esta etapa.

Al profesor Hugo Alfonso Rojas Sarmiento, por su orientación y acompañamiento.

A Leidy Rache, por sus contribuciones, asesoramiento y ayuda.

A Alejandra Rodríguez, por su constante ayuda, apoyo y acompañamiento en este proceso.

A Mónica Becerra y a la profesora Sandra Chaparro, por su apoyo y acompañamiento en el día a día.

A COLCIENCIAS, por el apoyo financiero en el marco del proyecto de la Red Europea de áreas de Investigación; ERANet LAC (referencia ELAC2014/BEE-0341): Contrato: Colciencias-UPTC 506-2015.

RESUMEN

El ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico (HMFCa) es importante como monómero en la síntesis de diversos poliésteres y tiene posible actividad antitumoral. Se obtiene por la oxidación selectiva del grupo formilo del 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Sin embargo, la obtención de HMFCa por métodos químicos convencionales presenta varias desventajas, como la gran cantidad de hidróxido de sodio usado y las altas temperaturas, lo cual, a nivel industrial, representa una importante cantidad de contaminantes y altos costos en su producción. Además, la utilización de catalizadores sólidos con metales de alto valor, hace que el proceso de síntesis de HMFCa sea costoso. Como respuesta a esta problemática, se han utilizado métodos biotecnológicos de síntesis menos contaminantes y económicamente sustentables como las fermentaciones, con las cuales es posible obtener productos de alto valor agregado, como el HMFCa, cuando se optimizan las condiciones para el crecimiento de los microorganismos. En la presente investigación, partiendo de residuos de bagazo de caña se aisló una cepa bacteriana capaz de degradar 5-HMF y convertirlo selectivamente en HMFCa. De acuerdo con la secuenciación del gen ribosomal 16S, la cepa bacteriana pertenece a la especie *Serratia marcescens*. La oxidación de 5-HMF a HMFCa se llevó a cabo en fermentaciones con las células completas. El seguimiento de la transformación de 5-HMF se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y el crecimiento bacteriano fue determinado por espectrofotometría UV-Vis. Se utilizaron dos fuentes de 5-HMF, una correspondiente a 5-HMF puro (5-HMFp) y la otra más económica, obtenida a partir de hidrolizados de fructosa, utilizando Nb_2O_5 como catalizador (5-HMFf). Se determinó el nivel de tolerancia de *Serratia marcescens* a diferentes concentraciones de 5-HMFp y 5-HMFf. Se demostró que la bacteria fue capaz de metabolizar una concentración de 5-HMFf de 10 mM, a 30 °C y pH 8, obteniéndose un rendimiento hacia HMFCa del 78 % en 12 horas de reacción. Posteriormente, se evaluaron las condiciones de reacción: temperatura, pH y concentración de sustrato, en el rendimiento de HMFCa a partir de 5-HMFf con el uso del diseño Box-Behnken. Los resultados mostraron rendimientos por encima del 60% para HMFCa a 30 °C, pH 8, y una concentración de 5-HMF igual a 3 mM.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se confirmó la presencia de la familia piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasas en *S. marcescens*, como posible gen responsable de la transformación de 5-HMF a HMFCa. Asimismo, se usó la estrategia Fed-batch con control de la concentración de 5-HMFf, para obtener una mayor concentración del compuesto de interés en el medio de cultivo, llegando a obtener una concentración final de HMFCa de 790 mg L⁻¹, usando la fuente más económica de 5-HMF, sin microorganismos modificados genéticamente, y en 20 horas de reacción.

ABSTRACT

5-Hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid (HMFCa) is important as a monomer in the synthesis of various polyesters and has possible antitumor activity. It is obtained by the selective oxidation of the formyl group from 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF). However, obtaining HMFCa by conventional chemical methods has several disadvantages, such as the large amount of sodium hydroxide used and high temperatures, which, at an industrial level, represents a significant amount of pollutants and high production costs. In addition, the use of solid catalysts with high value metals makes the HMFCa synthesis process expensive. In response to this problem, biotechnological methods of synthesis that are less polluting and economically sustainable have been used, such as fermentations, with which it is possible to obtain products with high added value, such as HMFCa, when the conditions for the growth of microorganisms are optimized. In the present investigation, starting from cane bagasse residues, a bacterial strain capable of degrading 5-HMF and selectively converting it into HMFCa was isolated. According to the sequencing of the 16S ribosomal gene, the bacterial strain belongs to the species *Serratia marcescens*. The oxidation of 5-HMF to HMFCa was carried out in fermentations with whole cells. The follow-up of the 5-HMF transformation reaction was performed by high-resolution liquid chromatography (HPLC) and bacterial growth was determined by UV-Vis spectrophotometry. Two sources of 5-HMF were used, one corresponding to pure 5-HMF (5-HMFp) and the other more economical, obtained from fructose hydrolysates (5-HMFf), using Nb₂O₅ as a catalyst. The tolerance level of *Serratia marcescens* was determined at different concentrations of 5-HMFp and 5-HMFf. It was demonstrated that the bacteria was able to metabolize a concentration of 5-HMFf of 10 mM, at 30 °C and pH 8, obtaining a yield towards HMFCa of 78% in 12 hours of reaction. Subsequently, the reaction conditions were evaluated: temperature, pH and substrate concentration, in the yield to HMFCa from 5-HMFf with the use of the Box-Behnken design. The results showed yields above 60 % for HMFCa at 30 °C, pH 8, and a concentration of 5-HMF equal to 3 mM.

Through the polymerase chain reaction (PCR), the presence of the family pyridine nucleotide disulfide oxidoreductases in *S. marcescens* was confirmed as a possible gene responsible for the transformation of 5-HMF to HMFCa. Also, the Fed-batch strategy with control of 5-HMFf concentration was used to obtain a higher concentration of the compound of interest in the culture medium, reaching a final HMFCa concentration of 790 mg L⁻¹, using the most economical source of 5-HMF, without genetically modified microorganisms, and in 20 hours of reaction.

INDICE DE CONTENIDO

Pág.

1	INTRODUCCIÓN	15
1.1	Planteamiento del problema	17
1.2	Objetivos	18
1.2.1	Objetivo general	18
1.2.2	Objetivos específicos	18
1.3	Marco teórico	19
1.3.1.	Química de los furfurales.....	19
1.3.2	Biodegradación de furfurales.....	20
1.3.3	5-Hidroximetilfurfural (5-HMF) como molécula plataforma.....	22
1.3.4	Ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico (HMFCa).....	23
1.3.5	Fermentación como estrategia para la producción económica y eficiente de compuestos de alto valor agregado.	25
1.4	Estado del arte	27
1.4.1	Obtención de HMFCa por métodos químicos.	27
1.4.2	Obtención de HMFCa por métodos biotecnológicos y uso de la estrategia en lote alimentado (Fed- batch).	29
2	EXPERIMENTAL	33
2.1	Aislamiento e identificación de las bacterias empleadas para la degradación de 5-HMF	33
2.1.1	Aislamiento de las bacterias empleadas para la degradación de 5-HMF.....	33
2.1.2	Identificación de las bacterias empleadas para la degradación de 5-HMF	33
2.1.3	Capacidad productora de HMFCa	33
2.2	Tolerancia de la cepa a 5-HMF (substrato)	34
2.3	Efecto de las condiciones de reacción en la biosíntesis de HMFCa	34
2.3.1	Optimización de las condiciones de reacción en la biosíntesis de HMFCa..	35
2.4	Determinación del crecimiento bacteriano.....	35
2.5	Seguimiento de la reacción.	36
2.6	Identificación de los genes involucrados en la biotransformación de 5-HMF.....	37
2.6.1	Extracción de ADN.....	37
2.6.2	Búsqueda de genes y diseño de oligonucleótidos	37
2.6.3	Reacción en cadena de la polimerasa (con su sigla en inglés PCR)	37
2.7	Evaluación de la biosíntesis por fermentaciones en lote alimentado de 5-HMF ..	38

3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1	Aislamiento e identificación de las bacterias empleadas para la degradación de 5-HMF.....	39
3.1.1	Identificación genotípica de la cepa seleccionada	40
3.1.2	Capacidad productora de HMFCa	40
3.1.3	Selección del medio de Cultivo	41
3.2	Tolerancia de la cepa a 5-HMF (sustrato).....	43
3.3	Efecto de las condiciones de reacción en la producción de HMFCa	47
3.3.1	Optimización de las condiciones de reacción para obtener HMFCa	50
3.4	Identificación de los genes involucrados en la biotransformación de 5-HMF.....	54
3.4.1	Búsqueda de genes y diseño de oligonucleótidos	54
3.4.2	Identificación de los genes involucrados en la biotransformación de 5-HMF mediante PCR	55
3.5	Biosíntesis por fermentaciones en lote alimentado de 5-HMF	58
4	CONCLUSIONES.....	60
5	RECOMENDACIONES.....	61
6	ANEXOS.....	62
7	CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA.....	66
7.1	Artículos	66
7.2	Participación en eventos	66
8	REFERENCIAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Estructura química del furano.	19
Figura 2. Ruta catabólica de 5-HMF (A) y Furfural (B) en <i>C. basilensis</i> HMF14.....	21
Figura 3. Diagrama representativo de la obtención de compuestos furánicos a partir de celulosa	22
Figura 4. Oxidación aeróbica de 5-HMF en medio acuoso	23
Figura 5. Reacción de Cannizzaro para la obtención de HMFCa.....	24
Figura 6. Rutas de oxidación de 5-HMF por microorganismos.....	25
Figura 7. Espectrómetro UV-Vis WHITTAKER ELX808.....	36
Figura 8. Cromatógrafo líquido de alta resolución Knauer modelo Azura	36
Figura 9. Capacidad de transformación de 5-HMF en HMFCa de las 3 cepas bacterianas aisladas de bagazo de caña.....	39
Figura 10. Árbol de distancia construido a través del método “Neighbor Joining”......	40
Figura 11. a) Reacción de transformación de 5-HMFp. b) Crecimiento observado en <i>Serratia marcescens</i>	40
Figura 12. a) Efecto de los medios de cultivo en el crecimiento de <i>Serratia marcescens</i> . b) Efecto de los medios de cultivo en el rendimiento de HMFCa.	41
Figura 13. Espectro de absorción UV-Vis de la prodigiosina producida por <i>Serratia marcescens</i>	42
Figura 14. Efecto del uso de una fuente auxiliar de carbono en: a) Rendimiento de HMFCa y b) Crecimiento de <i>Serratia marcescens</i>	43
Figura 15. Cromatograma típico del hidrolizado de fructosa	44
Figura 16. Reacción de transformación de 5-HMFf.	44
Figura 17. Crecimiento observado para <i>Serratia marcescens</i> en la reacción de transformación de 5-HMFf.	45
Figura 18. Efecto de la concentración de 5-HMFf en: a) la síntesis de HMFCa y b) Crecimiento de <i>Serratia marcescens</i>	46
Figura 19. Efecto de la concentración de 5-HMFp en: a) la síntesis de HMFCa y b) Crecimiento de <i>Serratia marcescens</i>	47
Figura 20. Influencia de la D.O. inicial en el rendimiento hacia HMFCa.....	48
Figura 21. Influencia del pH en: a) Rendimiento hacia HMFCa y b) Crecimiento de <i>Serratia marcescens</i>	49
Figura 22. Influencia de la temperatura en: a) Rendimiento hacia HMFCa, b) Rendimiento hacia FDCA y c) Crecimiento de <i>Serratia marcescens</i>	50
Figura 23. Línea ajustada: Rendimiento experimental vs. rendimiento predicho para HMFCa	52

Figura 24. Pareto de los efectos para el rendimiento de HMFCa	52
Figura 25. Gráficos de superficie tridimensionales para el rendimiento de HMFCa (%) a) [5-HMF], pH; b) [5-HMF], Temperatura y c) Temperatura, pH.	54
Figura 26. Confirmación de la presencia de la piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa en <i>Serratia marcescens</i>	56
Figura 27. Efecto de la concentración de 5-HMFf en; a) síntesis de HMFCa y b) Crecimiento de <i>Serratia marcescens</i>	58
Figura 28. a) Biosíntesis de HMFCa por la estrategia en lote alimentado y b) Crecimiento de <i>Serratia marcescens</i>	59
Figura A1. Efecto de la concentración de 5-HMFf en la síntesis de HMFCa	64
Figura A2. Efecto de la concentración de 5-HMFp en la síntesis de HMFCa	64
Figura A3. Efecto de la concentración de 5-HMFf presente en hidrolizados de fructosa en la síntesis de a) HMFCa y b) FDCA.....	65

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Propiedades y características de algunos compuestos furánicos	19
Tabla 1. <i>Continuación</i>	20
Tabla 2. Métodos de alimentación en cultivos tipo lote alimentado.....	26
Tabla 3. Condiciones para la obtención de HMFCa y rendimientos alcanzados utilizando métodos químicos.	28
Tabla 4. Microorganismos utilizados y condiciones para la obtención de HMFCa	30
Tabla 4. <i>Continuación</i>	31
Tabla 5. Enzimas utilizadas y condiciones para la obtención de HMFCa.....	31
Tabla 6. Rango experimental y niveles para las variables independientes del rendimiento de HMFCa.....	35
Tabla 7. Resultados de la caracterización morfológica de las cepas aisladas.....	39
Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA)	51
Tabla 9. Condiciones óptimas predichas y observadas para el rendimiento de HMFCa...	51
Tabla 10. Cebadores usados en este trabajo.....	55
Tabla A1. Factores de respuesta para el sustrato y productos obtenidos de la oxidación biocatalítica de 5-HMF	62
Tabla A2. Datos experimentales y valores predichos para el rendimiento de HMFCa.....	62
Tabla A3. Análisis de varianza	63

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HMF	5-hidroximetilfurfural
HMFCa	Ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico
FDCA	Ácido 2,5-furandicarboxílico
FFCA	Ácido 5-formil-2-furandicarboxílico
DHMF	2,5-dihidroximetilfurano
DFF	Furan-2,5-dicarbaldéhidó
5-HMFp	5-hidroximetilfurfural puro
5-HMff	5-hidroximetilfurfural presente en hidrolizados de fructosa
D.O.	Densidad óptica
MMS	Medio mínimo de sales
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (<i>High performance liquid chromatography</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
NCBI	Centro Nacional para la información Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
BLAST	Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea ADN, ARN o proteínas. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina

FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
GSH	Glutación en forma reducida
GSSG	Disulfuro glutación forma oxidada

1 INTRODUCCIÓN

El bagazo de caña es un residuo con alto contenido de lignocelulosa y azúcares simples que pueden ser liberados mediante tratamiento hidrotérmico y/o enzimático, generando como subproductos derivados furánicos [1], entre los que está el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), el cual es oxidado por microorganismos capaces de degradar dicho compuesto. Así, el aislamiento de microorganismos desde este residuo industrial es de gran importancia.

Uno de los productos derivados de la oxidación del grupo formil del 5-HMF es el ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico (HMFCa), el cual es usado como monómero en la síntesis de diversos poliésteres y como precursor del ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA) [2,3], además de presentar posible actividad antitumoral [4,5].

La mayoría de los procesos para la obtención de HMFCa utilizan catalizadores heterogéneos. Sin embargo, los métodos por vía química convencional son industrialmente poco atractivos, debido a que implican condiciones de reacción tales como altas temperaturas, altas cantidades de hidróxido de sodio y catalizadores con metales preciosos, por lo que se hace pertinente su obtención por métodos biotecnológicos. En este sentido, el uso de la estrategia de fermentación por lote alimentado (Fed-batch), con control de la concentración de sustrato, permite obtener cultivos con altas concentraciones del compuesto de interés.

Los métodos biotecnológicos representan una opción eficaz y prometedora para complementar o reemplazar métodos químicos para transformaciones orgánicas, debido a una serie de ventajas como excelente selectividad, bajas temperaturas de reacción, alta eficiencia y baja generación de subproductos tóxicos. Dentro de los métodos biotecnológicos, se tienen las fermentaciones, cuyo objetivo principal es encontrar las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo. En comparación con las enzimas aisladas, las células completas, pueden ser usadas para la oxidación-reducción de 5-HMF, porque su implementación refleja bajos costos, son más estables y no requieren de complejos sistemas de regeneración de cofactores, los cuales son necesarios para las enzimas aisladas [6].

El uso de células completas y enzimas para la obtención de productos derivados de la oxidación de 5-HMF es cada vez mayor, por lo cual se han establecido rutas de degradación de 5-HMF en algunos microorganismos. No obstante, la información de las rutas metabólicas es muy limitada y dependiente del microorganismo utilizado. La secuenciación del genoma de algunos de estos microorganismos se ha usado para encontrar los genes implicados en las rutas de regulación de procesos de transformación; razón por la cual es interesante confirmar

la presencia de las diferentes enzimas encargadas de la degradación de 5-HMF, y poder entender la ruta de oxidación.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo de investigación contribuye, de forma significativa, en la implementación de un método biotecnológico, usando microorganismos aislados de bagazo de caña en la obtención de HMFA como principal producto a partir de la oxidación biocatalítica de 5-HMF en fermentaciones.

1.1 Planteamiento del problema

Con el fin de encontrar microorganismos capaces de metabolizar compuestos derivados de la biomasa lignocelulósica y mejorar considerablemente la aplicación de esta como materia prima en fermentaciones, se han aislado microorganismos capaces de degradar 5-HMF [7], el cual se obtiene por deshidratación catalítica de hexosas, principalmente fructosa y glucosa. Sin embargo, solo se han reportado cuatro cepas bacterianas: *Methylovorus* sp MP688, *Burkholderia Cepacia* H-2, *Raoutella Ornithinolytica* BF60, *Cupriavidus Basilensis* HMF14 y diferentes enzimas aisladas de éstas, principalmente del tipo oxidoreductasas, que permiten la oxidación de 5-HMF a FDCA, y tres cepas fúngicas degradadoras de aldehídos furánicos: dos cepas de *Coniochaeta Rigniaria* [8,9] y una de *Amorphotheca Resinae* ZN1 [10].

Los procesos biocatalíticos que permiten la oxidación de 5-HMF traen la ventaja, en comparación con los métodos químicos convencionales (reacción de Cannizzaro): el disminuir el uso de grandes cantidades de hidróxido de sodio, las altas temperaturas y el uso de catalizadores sólidos con metales preciosos, lo que, a nivel industrial, representa grandes cantidades de contaminantes y altos costos de producción.

Los procesos de fermentación en lote reportados se llevan a cabo usando 5-HMF como única fuente de carbono, sin embargo, los rendimientos del producto deseado son bajos. También, se han realizado fermentaciones en lote alimentado en dos etapas: en la primera, se adiciona una fuente de carbono diferente al 5-HMF y, cuando éste se agota, se alimenta con 5-HMF [7]. En la segunda etapa, se utilizan medios comerciales, como el caldo Luria Bertanni para obtener una gran cantidad de biomasa; después de esto, las células son recuperadas por centrifugación y adicionadas al medio de reacción, en presencia de buffer fosfato de potasio y 5-HMF [11], incorporando otras etapas que hacen de este un proceso más complicado. El 5-HMF puede ser citotóxico, mutagénico, carcinogénico y genotóxico [12], por lo que puede generar alta toxicidad sobre algunos microorganismos [13].

Es importante mencionar que tanto el 5-HMF como sus derivados inhiben el crecimiento de microorganismos como bacterias y levaduras, complicando los procesos de fermentación. Por tal motivo, se planteó la posibilidad de usar microorganismos aislados de bagazo de caña, degradadores de compuestos furánicos para la obtención de HMFCa, pero se desconoce cuáles son las condiciones para la obtención del mismo, como único producto, mediante la oxidación de 5-HMF en fermentaciones con células bacterianas. Todo lo anterior está involucrado en la siguiente pregunta de investigación: *¿Cuáles son las condiciones que permiten alcanzar el máximo rendimiento de HMFCa como producto principal por la oxidación de 5-HMF en fermentaciones con células bacterianas?*

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Obtener HMFCa como producto principal, por la oxidación biocatalítica de 5-HMF usando microorganismos degradadores de furanos, aislados de bagazo de caña.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Aislar e identificar bacterias de bagazo de caña, capaces de degradar 5-HMF, para evaluar su capacidad productora de HMFCa.
- ✓ Identificar el nivel de tolerancia de la cepa a 5-HMF (sustrato).
- ✓ Establecer el efecto de las variables: densidad óptica (D.O.) inicial, pH y temperatura de reacción, en la biosíntesis de HMFCa.
- ✓ Realizar una primera aproximación para la identificación de los genes posiblemente implicados en la degradación de 5-HMF.
- ✓ Evaluar la biosíntesis de HMFCa por fermentaciones en lote alimentadas de 5-HMF.

1.3 Marco teórico

1.3.1. Química de los furfurales.

Los furfurales constituyen un grupo de compuestos químicos que tienen en común un anillo de furano, que les confiere gran estabilidad. El anillo furánico está compuesto por cuatro átomos de carbono con hibridación sp^2 y un átomo de oxígeno con hibridación sp^2 (Figura 1). Esto hace que el anillo presente seis electrones en la nube electrónica π , dos pares de electrones en los orbitales no enlazantes p de los átomos de carbono y un par de electrones del orbital no enlazante p del átomo de oxígeno. En su conjunto, el anillo presenta cinco enlaces σ y dos enlaces π . Entre los furfurales más comunes se encuentran los que se muestran en la Tabla 1.

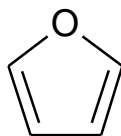
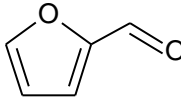
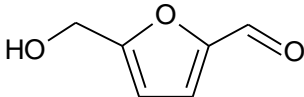
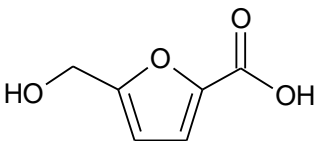
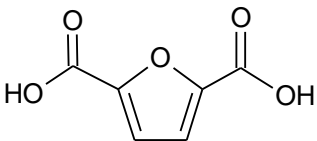


Figura 1. Estructura química del furano.

Tabla 1. Propiedades y características de algunos compuestos furánicos. Tabla adaptada [14].

Nombre del compuesto	Propiedades físicas	Fórmula empírica	Estructura
Furfural	Líquido a T ^a ambiente Peso molecular: 96,09 g/mol Punto de fusión -36,5 °C Punto de ebullición 161,7°C	C ₅ H ₄ O ₂	
5-Hidroximetilfurfural (5-HMF)	Sólido a T ^a ambiente Peso molecular: 126,11 g/mol Punto de fusión 30-34 °C Punto de ebullición 114-116°C	C ₆ H ₆ O ₃	

“Tabla 1. Continuación”

Nombre del compuesto	Propiedades físicas	Fórmula empírica	Estructura
Ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico (HMFCA)	Sólido a T ^a ambiente Peso molecular: 142,11 g/mol Punto de fusión 159-162 °C	C ₆ H ₆ O ₄	
Ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA)	Sólido a T ^a ambiente Peso molecular: 156,09 g/mol Punto de fusión 342 °C Punto de ebullición 420°C	C ₆ H ₄ O ₅	

1.3.2 Biodegradación de furfurales.

La capacidad de ciertos microorganismos de metabolizar furfural, 5-hidroximetilfurfural y sus derivados, puede ser aprovechada para la eliminación de este tipo de compuestos de hidrolizados lignocelulósicos. Los microorganismos capaces de degradar compuestos furánicos más caracterizados hasta el momento son bacterias Gram-negativas aerobias. La primera ruta metabólica aeróbica descrita para la biodegradación de furfurales fue propuesta por Trudgill (1969) en *P. putida* F2. Esta ruta fue modificada y verificada posteriormente por Koenig y Andreesen en 1990 y Koopman en 2010 [15–17]. En la ruta propuesta por Trudgill, observada en la Figura 2, el 5-HMF se oxida primero a ácido monocarboxílico correspondiente (HMFCA), que posteriormente, en una reacción catalizada por una oxidorreductasa específica, se oxida dando lugar al FDCA. Enseguida, FDCA se descarboxila, originando ácido furoico, que es convertido en ácido 2-oxo-glutárico para ser metabolizado a través del Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). De manera análoga a lo que ocurre con 5-HMF, el furfural se oxida a ácido furoico, el cual converge a la ruta descrita por Trudgill y colaboradores [14,17].

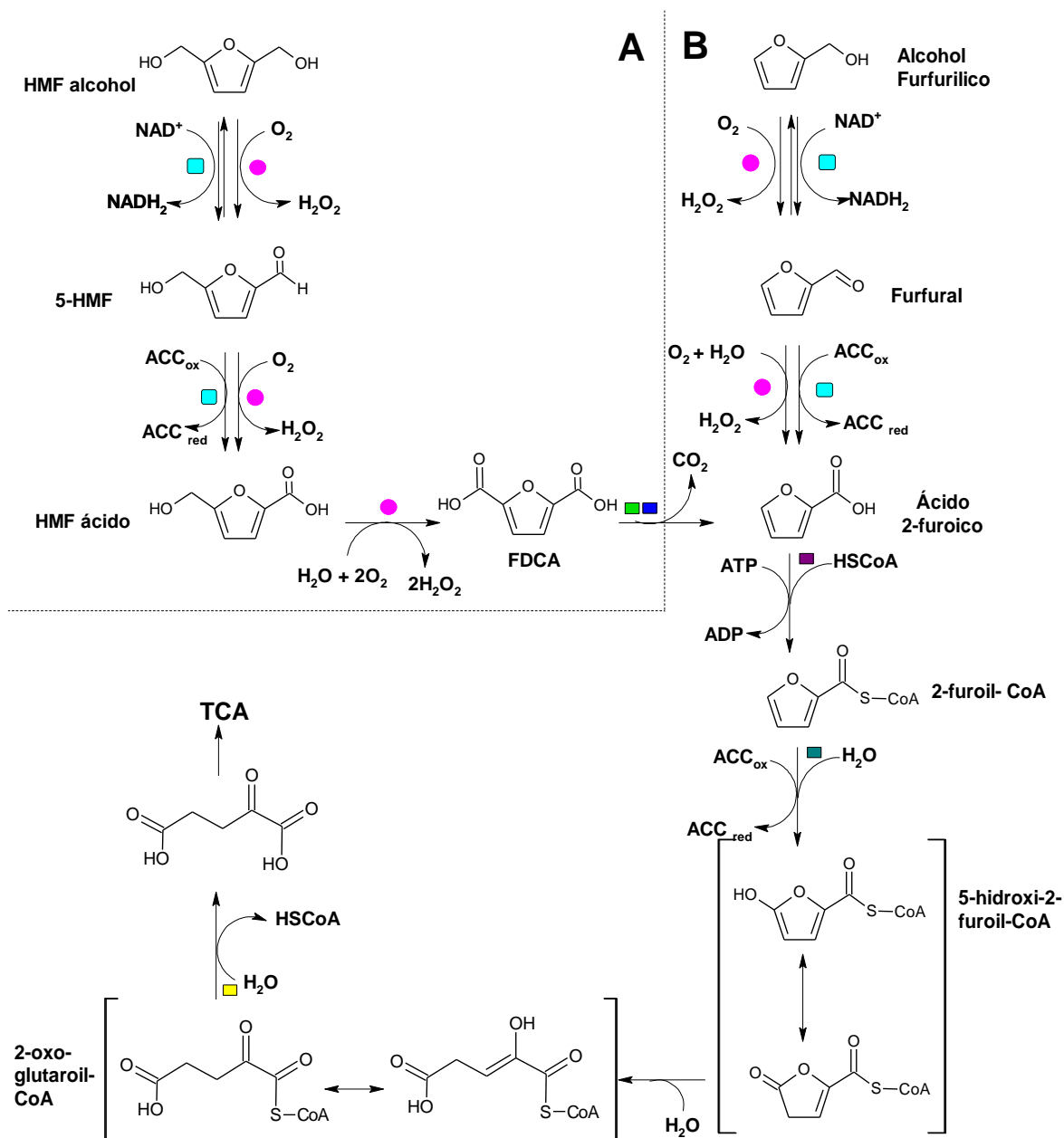


Figura 2. Ruta catabólica de 5-HMF (A) y Furfural (B) en *C. basilensis* HMF14. Los símbolos de colores indican las actividades de las siguientes enzimas: ● oxidoreductasa Furfural/5-HMF; ■ ■ descarboxilasa del ácido 2,5-furanocarboxílico; ■ 2-furoil CoA sintetasa; ■ furoil CoA deshidrogenasa; ■ 2-oxoglutaroyl CoA hidrolasa. Las reacciones entre paréntesis indican tautomerizaciones cetoenólicas. ACC: aceptor-receptor de electrones en forma oxidada (ox) o en forma reducida (red.). Esquema adaptado [13,15,17].

1.3.3 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF) como molécula plataforma

El 5-HMF se deriva principalmente de la deshidratación de fructosa, y ha sido descrito como un compuesto prometedor en la industria química [18], debido a sus transformaciones, como por ejemplo en la producción de biocombustibles, así como de compuestos químicos para la industria de los polímeros. El 5-HMF también se puede encontrar de forma natural en materiales que están formados por celulosa, ya que, al hidrolizarse, se transforma en subunidades de glucosa, y esta última, por medio de una vía de isomerización, se transforma en fructosa, la cual es considerada por varios autores, como el material de partida más adecuado para la obtención del 5-HMF (Figura 3) [19].

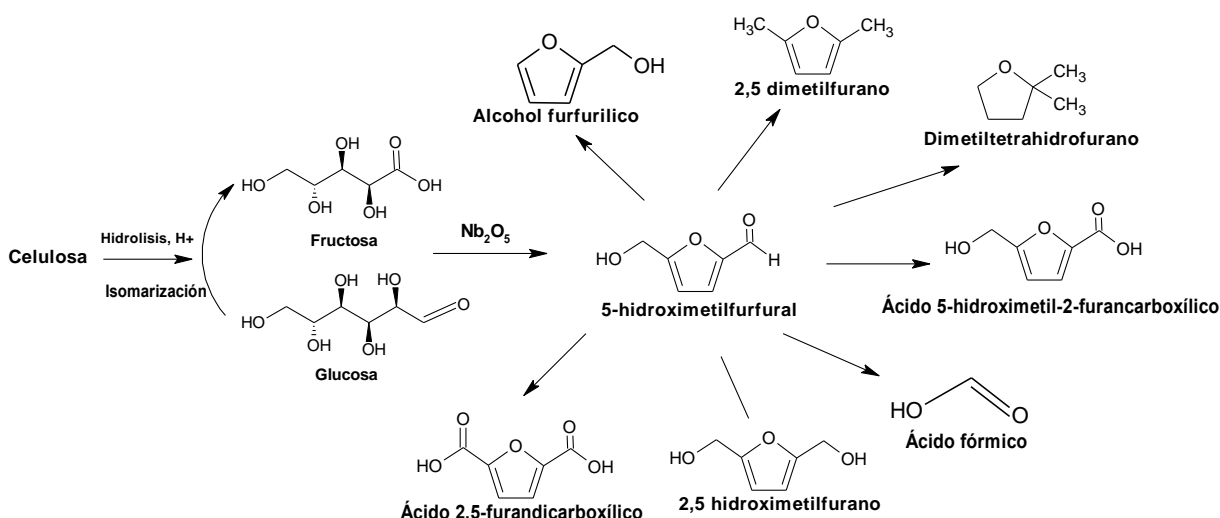


Figura 3. Diagrama representativo de la obtención de compuestos furánicos a partir de celulosa. Esquema adaptado [19].

El 5-HMF se puede encontrar en el bagazo de caña por su alto contenido de lignocelulosa y azúcares simples que pueden ser liberados mediante tratamiento hidrotérmico y/o enzimático, generando como subproductos derivados furánicos. El bagazo de caña es el subproducto o residuo fibroso de la caña azucarera, una vez realizado el proceso de fabricación del azúcar y de la panela, después de extraer el jugo azucarado por molinos o trapiches. Representa aproximadamente entre el 25 y 40 % del total de materia procesada, dependiendo del contenido de fibra de la caña y la eficiencia en la extracción del jugo. De forma general, está constituido por celulosa (50%), hemicelulosa (25%), lignina (20%) y otros componentes (5%) [20]. El bagazo tiene múltiples transformaciones, entre las cuales se destacan aquellas asociadas a la fermentación, en donde intervienen microorganismos (hongos y bacterias) tales como *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger*, y *Bacillus subtilis*.

1.3.4 Ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico (HMFCA)

1.3.4.1 Obtención de HMFCA por métodos químicos.

El HMFCA es uno de los productos derivados de la molécula plataforma 5-HMF. Inicialmente se oxida el grupo formil del 5-HMF [21–23] formándose un hemiacetal intermediario 1, que se puede oxidar a ácido 5-formil-2-furandicarboxílico (FFCA), y este, a través de un intermediario hemiacetal 2, se convierte en ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA), como se evidencia en la Figura 4 [23,24].

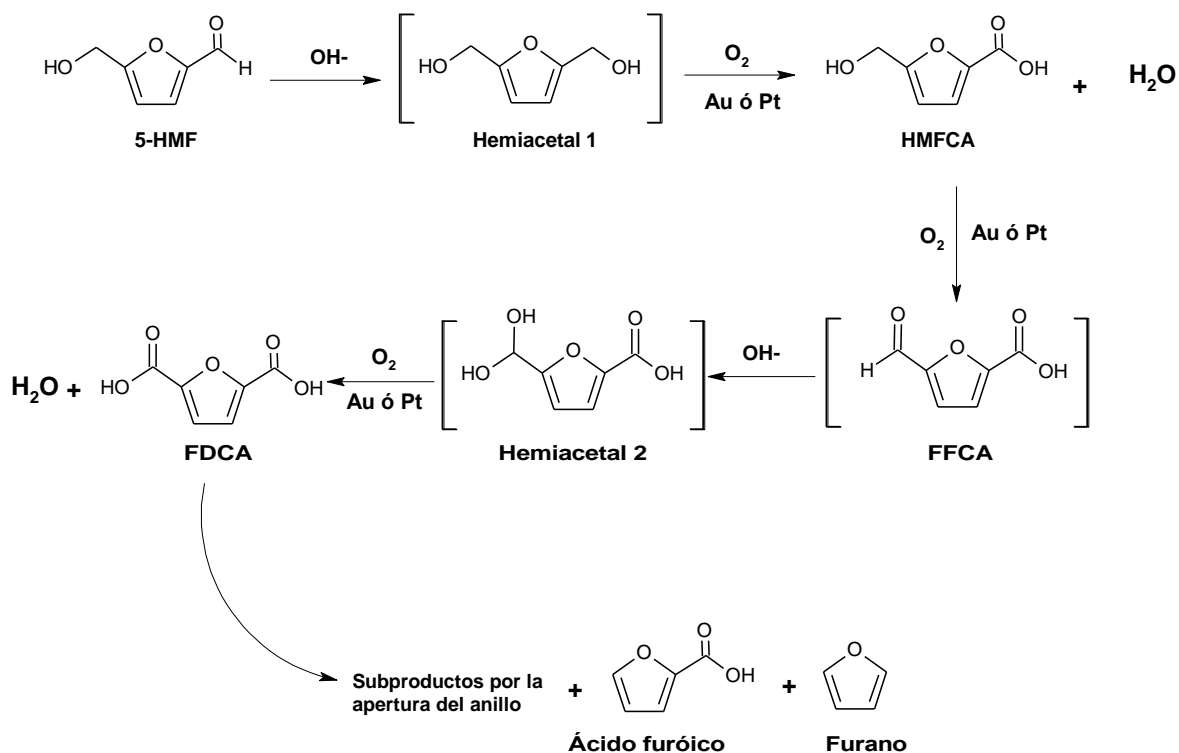


Figura 4. Oxidación aeróbica de 5-HMF en medio acuoso. Tomado de [23,24].

La reacción de Cannizzaro es una de las rutas para la formación de HMFCA, en la que una molécula de aldehído actúa como un donador de hidruro y la otra como aceptor, dando como resultado una sal de ácido carboxílico y un alcohol, respectivamente [23,25–27]. Debido a que se obtiene una mezcla equimolar, tanto de un alcohol primario como de una sal de ácido carboxílico, el rendimiento máximo posible para cada producto es sólo del 50%. Sin embargo, la reacción de Cannizzaro que se presenta en la figura 5, es una de las vías más eficaces para la producción simultánea de 2,5-dihidroximetilfurano (DHMF) y HMFCA.

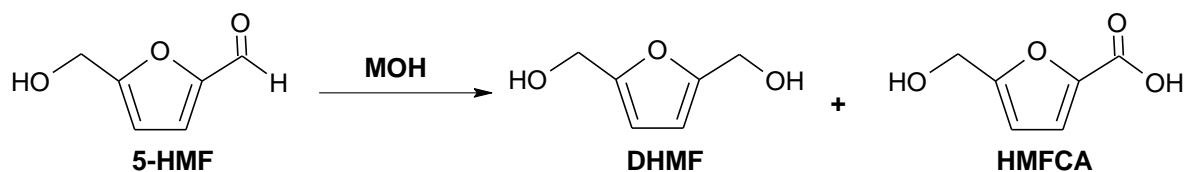


Figura 5. Reacción de Cannizzaro para la obtención de HMFA. Tomado de [24].

1.3.4.2 Obtención de HMFA por métodos biotecnológicos.

La bioconversión, es la aplicación de la biotecnología en la producción de diferentes tipos de moléculas utilizando enzimas o células completas. Los aldehídos en general son tóxicos para las células vivas, porque provocan graves daños a las proteínas, ácidos nucleicos y orgánulos, a través de la formación de especies reactivas de oxígeno. Además, los aldehídos furánicos también inhiben enzimas esenciales en el metabolismo primario [28]. Debido a esto, muchos organismos han evolucionado para producir enzimas como la aldehído deshidrogenasa 'genérica', que convierte estos aldehídos en sus formas de ácido o alcohol que son menos tóxicos para las células [13].

Las enzimas que intervienen directamente en la oxidación de 5-HMF a HMFA son de tipo oxidoreductasas y catalasas [29] y son una estrategia atractiva en la producción de HMFA a nivel industrial. Aunque el uso de enzimas libres es un método viable para la obtención de productos derivados de la oxidación de 5-HMF con altos rendimientos, estos procesos de oxidación implican el uso de complejos sistemas de regeneración de cofactores generando altos costos de producción en comparación con el uso de células completas [6].

La figura 6 muestra dos rutas de oxidación del 5-HMF. En la primera ruta, el grupo aldehído del 5-HMF es oxidado a ácido carboxílico, obteniendo HMFA. En la segunda ruta, se oxida primero el grupo alcohol del 5-HMF al correspondiente aldehído para producir furan-2,5-dicarbaldehído (DFF) [29]. De esta manera, es posible que las enzimas actúen en cualquiera de las dos rutas, debido a que algunas, como la 5-HMF oxidasa (HMFO), muestran actividad sobre diferentes sustratos (alcohol furfúrico, diformil furano, alcohol bencílico, entre otros) [30].

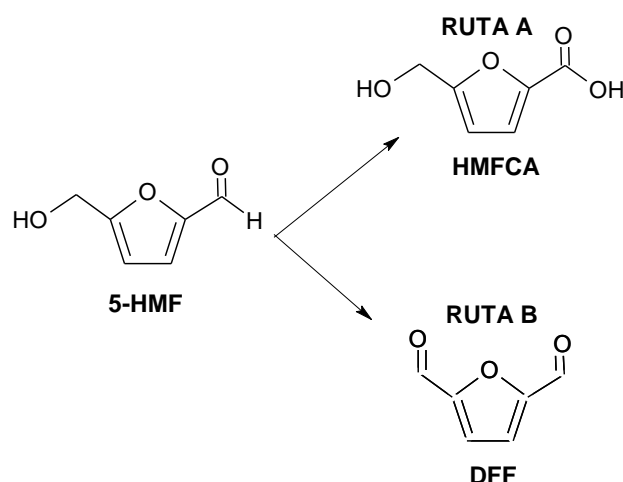


Figura 6. Rutas de oxidación de 5-HMF por microorganismos. Tomado de [29].

1.3.5 Fermentación como estrategia para la producción económica y eficiente de compuestos de alto valor agregado.

Para aumentar la concentración, productividad y rendimiento de compuestos de alto valor agregado en la industria química, se han fortalecido los procesos de fermentación, desarrollando estrategias de cultivo que optimicen los procesos de síntesis [31]. De esta manera, se han utilizado principalmente tres tipos de fermentación: cultivo en lote, cultivo continuo y cultivo alimentado.

- **Cultivo en lote:** Este tipo de cultivo se lleva a cabo utilizando un volumen fijo de medio, en donde los nutrientes y el inóculo son adicionados al comienzo de la fermentación. En este tipo de proceso las únicas líneas de entrada y salida son las de aireación. Este sistema permite la evaluación y descripción de las fases de crecimiento microbiano. [32].
- **Cultivo continuo:** Se busca mantener las células en etapa de producción, adicionando constantemente nutrientes al medio de cultivo y retirando células y productos, ambos procesos a la misma velocidad, de manera que el volumen dentro del fermentador permanezca constante [32,33].
- **Cultivo alimentado:** En el cultivo por lote alimentado, los nutrientes son continuamente o semi-continuamente alimentados, mientras que el efluente es removido discontinuamente. Este sistema es utilizado principalmente para disminuir efectos de inhibición en el crecimiento por sustrato o represión catabólica mediante la adición intermitente de nutrientes, llegando a mejorar la productividad de la fermentación [32].

Casi siempre, los cultivos por lote alimentado son llevados a cabo como una fermentación de dos fases. En la primera fase, las células son cultivadas hasta un máximo de densidad celular que puede hacerse en un medio mínimo. Y en la segunda fase, solo se adicionan los nutrientes necesarios para optimizar la producción del metabolito de interés [34,35]. En la Tabla 2, se presentan las estrategias utilizadas en cultivos de lote alimentado.

Tabla 2. Métodos de alimentación en cultivos tipo lote alimentado. Tabla adaptada [35].

Tipo de control	Método	Descripción
Sin control de la retroalimentación	Alimentación a velocidad constante	- Alimentación de nutriente a velocidad constante. - La tasa específica de crecimiento decrece continuamente.
	Alimentación aumentando velocidad	- La alimentación aumenta a una velocidad específica (gradual, paso a paso o lineal). - La disminución en la tasa de crecimiento es menor.
	Alimentación exponencial	- La velocidad de alimentación aumenta exponencialmente. - La velocidad específica de crecimiento es constante.
Control de la retroalimentación	OD-stat	- Alimentación de nutriente cuando el oxígeno disuelto (OD) empieza a aumentar, debido al agotamiento de la fuente de carbono.
	pH-stat	- Alimentación de nutriente cuando el pH empieza a aumentar, debido al agotamiento del sustrato.
	Velocidad de producción de dióxido de carbono	- Este es medido en línea usando espectrometría de masas. La tasa de evolución de dióxido de carbono da una medida aproximada del consumo de la fuente de carbón. - Es el método más utilizado en el control de la velocidad de crecimiento.
	Concentración celular	- La velocidad de alimentación se determina de acuerdo a la concentración celular.
Control directo	Control de la concentración de sustrato	- La alimentación es directamente controlada por la concentración de la fuente de carbono principal, mediante mediciones “on-line”.

1.4 Estado del arte

1.4.1 Obtención de HMFCa por métodos químicos.

El 5-HMF ha permitido la obtención de productos químicos de alto valor agregado por oxidación, hidrogenación, condensación y reducción, esto debido a que posee un fragmento alcohólico y uno aldehídico [21]. Uno de estos productos es el HMFCa, el cual es usado como compuesto de partida para la síntesis de diversos poliésteres. Normalmente, el HMFCa es obtenido en presencia de una solución alcalina. Se ha demostrado que se requiere menos cantidad de base, generalmente 2,5 equivalentes de NaOH para producir HMFCa empleando catalizadores metálicos soportados, en comparación con la obtención de FDCA que requiere mayor cantidad de dicho hidróxido [36].

De esta manera, HMFCa es uno de los productos derivados del 5-HMF y puede ser obtenido por la reacción de Cannizzaro, que implica un exceso de hidróxido en una solución acuosa a altas temperaturas. Como alternativa a esta problemática, Kang *et al.* [37] proponen un método de síntesis eficiente y poco contaminante para la síntesis de HMFCa, usando líquidos iónicos como solventes reutilizables bajo condiciones libres de agua y a temperatura ambiente. La condición de reacción libre de agua se presenta como una ventaja adicional, especialmente para la reacción de Cannizzaro puesto que el 5-HMF es inestable en solución acuosa.

La reacción de Cannizzaro implica el uso de diferentes bases, como, por ejemplo: NaOH, KOH, Na₂CO₃ y CaCO₃. Verdeguer *et al.* [38], encontraron que la base de hidróxido era más eficaz en la producción de FDCA que la base de carbonato, lo que favoreció la producción de HMFCa. Además, la reacción secuencial del intermediario HMFCa a FDCA se acelera, aumentando la temperatura de reacción a valores mayores de 200 °C, por lo que se debe tener en cuenta que la transformación de HMFCa a FDCA es el paso limitante de la reacción.

La oxidación de 5-HMF a FDCA también se ha llevado a cabo sobre nanopartículas bimetalicas de Pd-Au. Aunque, las nanopartículas monometálicas Au y Pd formaron HMFCa, con nanopartículas de Pd el HMFCa no continua la transformación a FDCA, mientras que con Au y sistemas bimetalicos de Pd-Au sí se da la oxidación a FDCA. Sin embargo, con ambos catalizadores y bajo condiciones similares de reacción, la mayor parte de 5-HMF se transformó en HMFCa, pero Pd-TiO₂ produjo una cantidad ligeramente inferior de FDCA que Au-TiO₂. Con este experimento Lolli *et al.* demostraron que la ausencia de la base indujo la desprotonación de 5-HMF a HMFCa y 2,5-bishidroximetilfurano (BHMF) bajo las condiciones de reacción utilizadas. No obstante, se degradó una cantidad significativa de 5-HMF observándose una conversión del 57 % de 5-

HMF después de 30 min de reacción [39]. En la Tabla 3, se muestran resultados relevantes en cuanto a los rendimientos de HMFA obtenidos por métodos químicos.

Tabla 3. Condiciones para la obtención de HMFA y rendimientos alcanzados utilizando métodos químicos.

Catalizador	Condiciones	Rendimiento HMFA	Ref.
1-etil-3-metilimidazolio bis (trifluorometilsulfonyl) imida [EMIm]TFSI	1 ml de catalizador, 0,001 M de 5-HMF, 0,005 M de NaOH, 0 °C.	88 %	Kang <i>et al.</i> [37]
Nanopartículas de Au/TiO ₂	0,197 g de catalizador, 0,001 M de 5-HMF 0,002 M de NaOH, atmósfera inerte de hidrógeno en ausencia de oxígeno, 30 °C, 18 h.	51 %	Gorbanev <i>et al.</i> [36]
Ru/CsPW	0,05 g de catalizador, 0,005 M de 5-HMF, flujo de oxígeno de 20 mL min ⁻¹ , 130 °C, 12 h.	72,9 %	Wang <i>et al.</i> [4]
Au/C y Au/TiO ₂	0,15 M de 5-HMF, 0,3 M de NaOH, 690 kPa de O ₂ , 22 °C, 6h	92 %	Davis <i>et al.</i> [40]
Ce _{0,85} Bi _{0,15} O ₂	0,1 g de catalizador, 0,15 M de 5-HMF, 0,6 M NaOH, 1,0 MPa O ₂ , 65 °C, 1 h.	64 %	Miao <i>et al.</i> [41]
Cu/CeO ₂	0,05 g de catalizador, 0,2 M de 5-HMF, 0,9 MPa O ₂ , 10 °C, 15 h.	1,2 %	Ventura <i>et al.</i> [21]
1,5(AuCu)-Ti	0,001 M de 5-HMF, 0,004 M de NaOH, 95 °C, 60 h.	92 %	Pasini <i>et al.</i> [42]
Complejo de arcilla montmorillonita K-10 inmovilizada en acetilacetato de molibdeno	0,15 g de catalizador, tolueno, flujo de oxígeno de 20 mL min ⁻¹ , 110 °C, 3 h,	86,9 %.	Zhang <i>et al.</i> [43]
Nanopartículas de oro soportadas en hidrotalcita	0,25 g de catalizador, 0,001 M de 5-HMF, flujo de oxígeno de 20 mL min ⁻¹ , 95 °C, 7 h.	87 %	Gupta <i>et al.</i> [44]

Aunque se ha estudiado ampliamente la oxidación de 5-HMF a FDCA, con obtención de HMFCa como subproducto, solo algunos estudios tienen como objetivo principal la obtención de HMFCa, compuesto de gran importancia para diferentes aplicaciones industriales. Como se muestra en la Tabla 3, la obtención de HMFCa por métodos químicos presenta varias desventajas, dentro de las que se puede mencionar la gran cantidad de hidróxido de sodio usada para su obtención, lo cual, a nivel industrial, representa una importante cantidad de contaminantes. Del mismo modo, la utilización de catalizadores con metales preciosos y la adición de oxígeno al medio de reacción, hacen que el proceso de síntesis de HMFCa sea demasiado costoso. Por tal motivo, en los últimos años se ha buscado mejorar los métodos de síntesis de este tipo de compuestos para que sea más eficiente y económica, por lo cual se plantea la utilización de métodos biotecnológicos, en donde el uso de microorganismos aislados puede contribuir a mejorar los rendimientos y selectividades hacia la obtención de HMFCa, así como bajos costos y el posible escalamiento del proceso a nivel industrial.

1.4.2 Obtención de HMFCa por métodos biotecnológicos y uso de la estrategia en lote alimentado (Fed- batch).

En comparación con los métodos químicos convencionales, los métodos biotecnológicos representan una ruta de síntesis con condiciones menos drásticas y de menor costo para compuestos de alto valor agregado. Hay dos formas de oxidación biocatalítica: la biocatálisis y las fermentaciones. En biocatálisis se han utilizado las cepas *Serratia liquefaciens* LF14, y *Comamonas testosteroni* SC1588 para la obtención de HMFCa, con rendimientos superiores al 95 %, aunque con tiempos de reacción largos (26 y 36 h, respectivamente) [45,46].

En fermentaciones, se ha realizado la oxidación biocatalítica de 5-HMF a FDCA, usando *Pseudomonas putida* S12 modificada genéticamente con el gen que codifica la oxidoreductasa hmfH de *Cupriavidus basilensis* HMF14, obteniéndose 25,6 g L⁻¹ de FDCA y 6,7 g L⁻¹ de HMFCa en 55 h [7]. En este trabajo, la fermentación por lote alimentado fue la estrategia usada para obtener una mayor cantidad del producto deseado en el medio de cultivo, permitiendo dar más uso al biocatalizador. Sin embargo, el objetivo de este, no fue la obtención de HMFCa como producto principal. Además, es importante mencionar que la bacteria usada fue modificada genéticamente, para generar una mayor selectividad de la bacteria hacia FDCA y llevar el proceso a una mayor escala.

También, se ha reportado el uso de la biocatálisis con enzimas como la *cloroperoxidasa* (CPO) de *Culduriomyces furnugo* y la *xantina oxidasa* (XO) de *Escherichia coli*, con peróxido de hidrógeno como agente oxidante, obteniéndose 38 % y 94 % de rendimiento para HMFCa, respectivamente [47]. Los resultados anteriores y otros resultados importantes

obtenidos por métodos biotecnológicos se detallan en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Microorganismos utilizados y condiciones para la obtención de HMFCa.

Microorganismo	Método	Condiciones	[HMFCa]	Rendimiento	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 8066	Fermentación	32 mM de 5-HMF, 278 mM de glucosa, 30 °C, 500 rpm, pH 5.0	0,28 mM	~1 %	Taherzadeh <i>et al.</i> [48]
<i>Pseudomonas syringae</i> SF4-17	Fermentación	0,08de 5-HMF, 27 °C, 2-3 días.	--	--	Terasawa <i>et al.</i> [49]
<i>Serratia liquefaciens</i> LF14	Biocatálisis	300 mM de 5-HMF, buffer fosfato de sodio, 30 °C, 26 horas.	291 mM	97 %	Mitsukura <i>et al.</i> [45]
<i>Pseudomonas putida</i> SI2 modificada genéticamente con el gen que codifica la oxidorreductasa hmfH de <i>Cupriavidus basilensis</i> HMF14	Fermentación, estrategia Fed-batch.	246 mM de 5-HMF, glicerol, sulfato de amonio, 30 °C, 55 h	48 mM	20 %	Koopman <i>et al.</i> [7]
<i>Amorphotheca resinae</i> ZN1	Fermentación	20 mg mL ⁻¹ de inóculo, 8 mM de 5-HMF, 5 mM de glucosa, 28 °C, 100 rpm, pH 5,5, 110 horas.	1,4 mM	18 %	Ran <i>et al.</i> [50]

“Tabla 4. Continuación”.

Microorganismo	Método	Condiciones	[HMFCA]	Rendimiento	Referencia
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> SC1103	Biocatálisis	20 mg mL ⁻¹ de inóculo, 50 mM de 5-HMF, buffer fosfato, 30 mM de glucosa, 35 °C, 200 rpm.	Trazas	<1 %	Li <i>et al.</i> [6]
<i>Comamonas testosteroni</i> SC1588	Biocatálisis	160 mM de 5-HMF, buffer fosfato, 20 mM de histidina, 30 °C, 150 rpm, pH 7, 36 h	156,8 mM	98%	Zhang <i>et al.</i> [46]

Tabla 5. Enzimas utilizadas y condiciones para la obtención de HMFCa.

Enzima	Método	Condiciones	[HMFCa]	Rendimiento	Referencia
Cloroperoxidasa (CPO) de <i>Culduriomyces furnugo</i>	Biocatálisis	50 mM de 5-HMF, H ₂ O ₂ como agente oxidante, pH 5, 2,5 h.	19 mM	38 %	Van Deurzen <i>et al.</i> [47]
<i>Xantina oxidasa</i> (XO) de <i>Escherichia coli</i>	Biocatálisis	26 mM de 5-HMF, buffer fosfato, H ₂ O ₂ como agente oxidante, 37 °C, 150 rpm, 7 horas.	24,4 mM	94 %	Qin <i>et al.</i> [3]

Como puede observarse en la tabla 4, solo 2 cepas bacterianas alcanzan porcentajes de rendimiento a HMFCa mayores al 90 % con el uso de la biocatálisis y las demás cepas alcanzan porcentajes menores al 40 % mediante fermentaciones. Cabe señalar que, en las fermentaciones, el éxito reside en mejorar o encontrar las condiciones óptimas para el

crecimiento del microorganismo, y que, además, estos rendimientos pueden mejorar usando estrategia Fed-batch. En la tabla 5, puede observarse que el proceso de oxidación de 5-HMF a HMFA puede llevarse a cabo con enzimas como la Xantina oxidasa (XO) de *Escherichia coli* con un 94 % de rendimiento para HMFA. Sin embargo, en este proceso se utiliza peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente oxidante. En este contexto, el uso de microorganismos aislados degradadores de compuestos furánicos presentes en la biomasa residual, puede contribuir a mejorar los rendimientos y selectividades hacia HMFA mediante fermentaciones. De esta manera el presente trabajo de investigación se propone como aporte al estado del arte al hacer uso de las fermentaciones para la síntesis de HMFA.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Aislamiento e identificación de las bacterias empleadas para la degradación de 5-HMF

2.1.1 Aislamiento de las bacterias empleadas para la degradación de 5-HMF

Se aislaron microorganismos de bagazo de caña panelera obtenidos de trapiches ubicados en el municipio de Togüi- Boyacá (latitud: 5.39056, longitud: -73.51667). El aislamiento se llevó a cabo mediante siembra por vertido en placa de cultivos enriquecidos en medio mínimo de sales (MMS), cuya composición incluye (en g L⁻¹): MgSO₄·7 H₂O, 0,20; CaCl₂·2 H₂O, 0,02; K₂HPO₄, 0,50; KH₂PO₄, 0,50; NH₄Cl, 0,50; FeSO₄·7 H₂O, 3,00; MnSO₄·H₂O, 0,50; CoCl₂·6 H₂O, 1,06; Na₂MoO₄·2 H₂O, 0,34; ZnSO₄·7 H₂O, 0,40; CuSO₄·5 H₂O, 0,50. El pH del medio se ajustó a 7,0 y en los casos que se necesitó medio sólido, se adicionó agar hasta una concentración de 1,50 g L⁻¹ [51]. Además, a los medios se le adicionó 3 mM de 5-HMF puro (5-HMFp) como fuente de carbono y 0,10 g L⁻¹ de extracto de levadura como fuente de vitamina [52].

2.1.2 Identificación de las bacterias empleadas para la degradación de 5-HMF

Los microorganismos aislados, capaces de utilizar 5-HMFp como fuente de carbono fueron caracterizados mediante observación, a través de su crecimiento en agar nutritivo y mediante la tinción de Gram para la determinación de la morfología celular. Una de las cepas se caracterizó molecularmente utilizando los iniciadores universales 27F y 1492R del gen ribosomal 16S [53]. La secuenciación de los amplicones se llevó a cabo mediante el método Sanger. Luego, se realizó el análisis taxonómico de la secuencia problema mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), comparando contra la base de datos RNA de referencia “*refseq_rna*”. Finalmente, se generó el árbol de similitud usando el método de “*Neighbor-Joining*”.

2.1.3 Capacidad productora de HMFCa

La capacidad productora de HMFCa fue evaluada por medio de fermentaciones a nivel laboratorio con las cepas capaces de degradar 5-HMFp, con un volumen de trabajo de 25 mL. Como condiciones de fermentación generales se tuvieron en cuenta: 25 mL de MMS, 3 mM de 5-HMFp, pH=6,5, D.O. inicial = 0,05, temperatura = 30 °C y agitación = 200 rpm. El tiempo de la fermentación fue definido de acuerdo con el crecimiento de las cepas. Durante la fermentación, se monitoreó el consumo de 5-HMFp, la producción de HMFCa y

el crecimiento de la cepa. Los controles utilizados fueron medio sin 5-HMFp y medio sin inóculo. Para el test catalítico, se seleccionó la cepa que presentó mayor rendimiento hacia el compuesto de interés.

El inóculo inicial para cada prueba se obtuvo cultivando las bacterias en caldo nutritivo con 3 mM de 5-HMFp a 30 °C de temperatura, con agitación a 200 rpm durante 12 h. Después de la incubación, las células se centrifugaron (6000 rpm, 5 min) [46] y se resuspendieron en 25 mL de MMS con y sin 5-HMFp, hasta obtener una densidad óptica (D.O.) de 0,05, según la prueba desarrollada. Además, se evaluó el efecto de la peptona (1 g L⁻¹) y de una fuente auxiliar de carbono: fructosa, glucosa y sacarosa (5 g L⁻¹) en la conversión de 5-HMFp.

Extracción de Prodigiosina: El medio de cultivo fue centrifugado a 6000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en una solución de etanol acidificado (4% de HCl 1 M en 96 mL de etanol), la mezcla se agitó y transfirió a un nuevo vial para la respectiva determinación del espectro de absorción UV-Vis en un rango de 300 a 800 nm [54].

2.2 Tolerancia de la cepa a 5-HMF (substrato)

Para determinar la tolerancia de la cepa a 5-HMF, se utilizaron dos fuentes de 5-HMF. 5-HMFp y 5-HMFf, este último obtenido por la preparación de hidrolizados, usando una solución de fructosa 0,046 M en agua, con Nb₂O₅ (V) como catalizador, a 180 °C durante 3 horas [55]. Las concentraciones de 5-HMFf evaluadas fueron 3,10 y 30 mM y 5-HMFp 3, 10, 30, 50 y 100 mM, se seleccionó la cepa que presentó su mejor rendimiento hacia HMFCa. Como medio de fermentación, se usó MMS, a pH 6,5, 30 °C de temperatura y una densidad óptica inicial de 0,05. Para el seguimiento de las fermentaciones, se determinó biomasa y se hizo cuantificación por HPLC.

2.3 Efecto de las condiciones de reacción en la biosíntesis de HMFCa

Para determinar el efecto de las condiciones de reacción en la obtención de HMFCa, se realizaron fermentaciones con la cepa seleccionada por su mejor rendimiento para HMFCa, con un volumen total de trabajo de 25 mL. Se utilizó para cada fermentación MMS y como condiciones generales: 5-HMFf 3 mM, pH=6,5, temperatura = 30 °C, D.O. inicial=0,05, y agitación = 200 rpm. De manera preliminar, se determinó el efecto de la D.O. inicial en el rendimiento de HMFCa en un rango de 0,5 a 3,0. Asimismo, se evaluó el efecto del pH (5,0 y 8,0) y de la temperatura (25 y 35 °C) [6]. Cada tratamiento se desarrolló por duplicado, utilizando como controles medio sin 5-HMFf y medio sin inóculo; además, se determinó biomasa y se hizo seguimiento por HPLC. Para el caso de pH y temperatura hubo un nivel

bajo y uno alto, comparado con el usado para llevar a cabo tanto el aislamiento como la selección de la mejor cepa por su producción de HMFCa y de acuerdo a los reportes presentados del crecimiento de la bacteria seleccionada.

2.3.1 Optimización de las condiciones de reacción en la biosíntesis de HMFCa.

Para la optimización de las condiciones de biosíntesis de HMFCa, se usó el diseño de Box-Behnken (DBB), teniendo en cuenta tres variables: temperatura de reacción (A), pH (B) y concentración de 5-HMFf (C). El nivel y el rango de las variables del proceso se resumen en la tabla 6. El proceso de optimización se realizó con 15 experimentos y 2 réplicas (ver anexo tabla A2). El rango de las variables del proceso se seleccionó en base a los experimentos preliminares. El modelo presenta la siguiente forma:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

Ecuación (1)

Donde Y es la respuesta predicha, β_0 constante del modelo; x_1 , x_2 y x_3 variables independientes; β_1 , β_2 y β_3 los coeficientes lineales; β_{12} , β_{13} and β_{23} los coeficientes de los productos cruzados y β_{11} , β_{22} and β_{33} los coeficientes cuadráticos [56]. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando Minitab 18 [57].

Tabla 6. Rango experimental y niveles para las variables independientes del rendimiento de HMFCa.

Variables	Símbolo	Nivel de la variable codificado		
		Bajo	Medio	Alto
		-1	0	1
Temperatura de reacción (°C)	A	25	30	35
Ph	B	5	6,5	8
Concentración de 5-HMFf (mM)	C	3	16,5	30

2.4 Determinación del crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO 600) usando un espectrómetro WHITTAKER ELX808 (figura 7), con microplacas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner). Se tomó 0,2 mL de la mezcla de reacción. Posteriormente, se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se tomó para hacer seguimiento de la fermentación por HPLC, mientras que el residuo se resuspendió en 0,2 mL

de solución salina 0,9% estéril y centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se adicionó y resuspendió el pellet en 0,2 mL de solución salina y se midió la absorbancia a 600 nm utilizando como blanco solución salina.



Figura 7. Espectrómetro UV-Vis WHITTAKER ELX808. Fuente: Laboratorio de Catálisis-UPTC.

2.5 Seguimiento de la reacción.

El seguimiento de la reacción de transformación de 5-HMF se realizó mediante HPLC. Las mezclas de reacción se filtraron y analizaron en un equipo HP-1100 equipado con una columna Knauer Eurokat H⁺ (300 x 4 mm, 10 μ m) usando un detector de UV a 280 nm para cuantificar 5-HMF, HMFCA y FDCA. La temperatura de la columna se mantuvo a 60 °C y la fase móvil fue H₂SO₄ (4 mM) con un flujo de 0,2 mL/min.



Figura 8. Cromatógrafo líquido de alta resolución Knauer modelo Azura. Fuente: Laboratorio de Catálisis-UPTC.

El rendimiento del producto Y (HMFCA ó FDCA) se definió de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento del producto Y (\%)} = \frac{\text{Concentración del producto Y}}{\text{Concentración inicial HMF}} \times 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

Se determinaron las concentraciones de 5-HMF, HMFCA y FDCA, utilizando los factores de respuesta obtenidos por el detector UV (ver anexo tabla A1) [55].

2.6 Identificación de los genes involucrados en la biotransformación de 5-HMF

2.6.1 Extracción de ADN

Se inocularon colonias individuales de la bacteria aislada y seleccionada en caldo nutritivo. Las colonias se incubaron durante 12 horas a 30°C. 1 mL del crecimiento bacteriano se centrifugó a 6000 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se utilizó para la extracción de ADN genómico, utilizando el kit comercial de Invitrogen PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad de ADN se cuantificó en un NanoDrop spectrophotometer ND1000 y en electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ADN extraído fue almacenado a -20°C hasta su uso.

2.6.2 Búsqueda de genes y diseño de oligonucleótidos

Inicialmente, se buscó en literatura los genes implicados en la síntesis de HMFCA, a partir de 5-HMF. Con la información obtenida, se utilizó la base de datos de NCBI para buscar en el genoma de la bacteria aislada y seleccionada, las secuencias de los genes, las cuales se usaron para diseñar oligonucleótidos, utilizando el software Primer3 [58], con los siguientes parámetros: 20-24 nucleótidos de longitud, 60-70% de contenido Guanina-Citosina (GC) y rangos de 600-700 pares de bases de tamaño del producto.

2.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (con su sigla en inglés PCR)

Se utilizaron oligonucleótidos para amplificar tres genes implicados en la transformación de 5-HMF. Las reacciones de PCR consistieron en: 0,4 mM de cada dNTP, 1X de DreamTaq™ buffer, 0,2 µM de cada primer, 0,025 U/µl de DreamTaq™ DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) y 25 ng/µl de ADN, en un volumen total de 10 µl. Las reacciones para cada gen incluyeron ADN de *Bacillus cereus* y un control negativo correspondiente a agua.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: denaturación inicial a 95 °C, durante 5 minutos; 30 ciclos de denaturación a 95°C, durante 30 segundos, anillamiento, durante 40

segundos a 56 °C para amplificar el gen piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasa, y a 57 °C para los genes aldehído-deshidrogenasa y el transportador principal de la superfamilia de facilitadores, y extensión a 72 °C durante 2 minutos; y extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Las reacciones se colocaron en un termociclador (Mastercycler). La visualización de los amplicones se realizó en gel de agarosa al 1 %.

2.7 Evaluación de la biosíntesis por fermentaciones en lote alimentado de 5-HMFf

Para aumentar la concentración de HMFCA en el medio de cultivo, se utilizó la estrategia por lote alimentado con control de la concentración de sustrato. Una vez seleccionada la cepa y establecida tanto la concentración inicial de 5-HMFf, como las condiciones óptimas de D.O., pH y temperatura, que generaron el mayor rendimiento de HMFCA en el diseño Box-Behnken, se inició la fermentación en lote alimentado en un volumen de 25 mL. Se alimentó 5-HMFf cada 4 horas, tomándose muestras en estos mismos tiempos, para hacer el respectivo seguimiento de la fermentación por HPLC y para la determinación del crecimiento bacteriano.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento e identificación de las bacterias empleadas para la degradación de 5-HMF.

Se aislaron de bagazo de caña, tres cepas bacterianas capaces de crecer en presencia de 5-HMF y de metabolizar este compuesto hacia HMFCa, lo que permitió corroborar que el bagazo de caña es un buen sustrato para encontrar y aislar microorganismos degradadores de 5-HMF [1]. Las cepas fueron caracterizadas morfológicamente por tinción de Gram, los datos se muestran en la tabla 7. El porcentaje de rendimiento de HMFCa de las tres bacterias es mostrado en la figura 9. Para la identificación genotípica fue seleccionada la cepa 1, la cual presentó mayor rendimiento hacia HMFCa (58%) a las 24 horas de reacción.

Tabla 7. Resultados de la caracterización morfológica de las cepas aisladas.

CEPA	GRAM
1	Bacilos Gram negativos
2	Bacilos Gram negativos
3	Cocobacilos Gram negativos

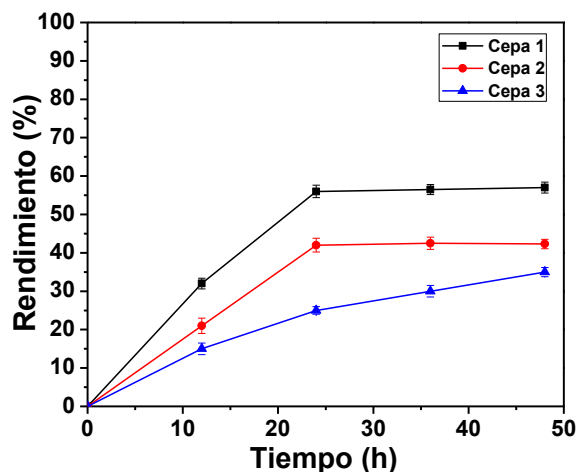


Figura 9. Capacidad de transformación de 5-HMF en HMFCa de las 3 cepas bacterianas aisladas de bagazo de caña. Condiciones de reacción: MMS con 3 mM de 5-HMFp, D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=6.5, agitación=200 rpm.

3.1.1 Identificación genotípica de la cepa seleccionada

La identificación genotípica de la cepa 1 se llevó a cabo por la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa del gen 16S. El árbol de distancia obtenido por el método “*Neighbor Joining*” muestra que la secuencia analizada pertenece al género *Serratia* y tiene el mismo origen que la cepa *Serratia marcescens* UMH1. La cepa analizada tiene una identidad del 99% con la especie *S. marcescens*. La figura 10, muestra en negrita la ubicación de las secuencias del gen 16S rRNA obtenido a partir de la cepa analizada.

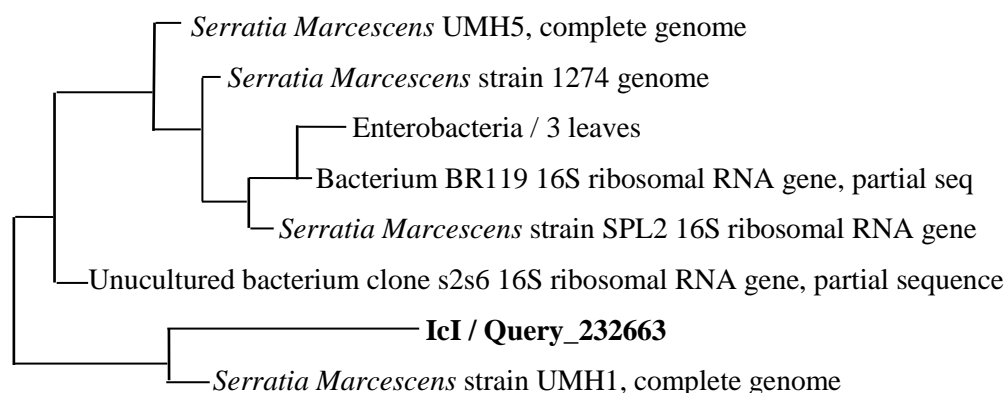


Figura 10. Árbol de distancia construido a través del método “*Neighbor Joining*”.

3.1.2 Capacidad productora de HMFCA

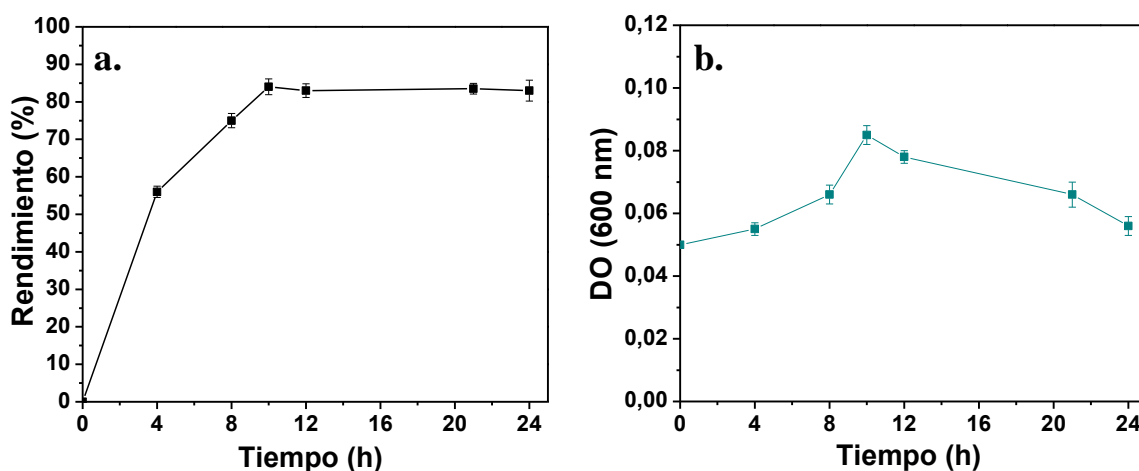


Figura 11. a) Reacción de transformación de 5-HMFp. b) Crecimiento observado para *Serratia marcescens*. Condiciones de reacción: MMS con 3 mM de 5-HMF, D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=6,5, agitación=200 rpm.

Inicialmente, se evaluó la capacidad de producción de HMFCa de *Serratia marcescens*. Los resultados mostraron que se obtuvo un rendimiento del 84 % en 10 horas, tiempo después del cual se evidenció acumulación de HMFCa en el medio (figura 11a), posiblemente porque la producción del mismo inhibió el crecimiento de *Serratia marcescens* y por ende su actividad catalítica (figura 11b). Aunque ya se ha identificado una cepa del género *Serratia* como degradadora de furano [45], este es el primer estudio en el que *S. marcescens* es descrita como una cepa degradadora de 5-HMF aislada de bagazo de caña.

3.1.3 Selección del medio de cultivo

El crecimiento de *Serratia marcescens* fue mejor en caldo nutritivo (CN), en comparación con medio mínimo de sales (MMS). Es así que, comparando el crecimiento de *S. marcescens* con 5-HMF, después de 18 h, en CN fue posible obtener una D.O. de 1,0 mientras que en MMS fue posible obtener una D.O. de 0,1 (figura 12a). Por consiguiente, la degradación de 5-HMF se observó más en CN que en MMS (figura 12b), probablemente debido al mayor crecimiento de la bacteria o al efecto de alguno de los componentes del CN que favorecen la degradación de 5-HMF. Un estudio previo mostró que la peptona es capaz de transformar 5-HMF por la presencia en su estructura de aminoácidos libres, como la glicina [59]. Por esto, con el fin de descartar el efecto de los componentes del medio de cultivo, se determinó si la peptona influía en la conversión de 5-HMF. En la Figura 12, se puede observar que la peptona presentó un rendimiento del 7 % hacia HMFCa en 8 horas; corroborando lo indicado por Nikolov *et al.* sobre la influencia de la peptona en la transformación de 5-HMF.

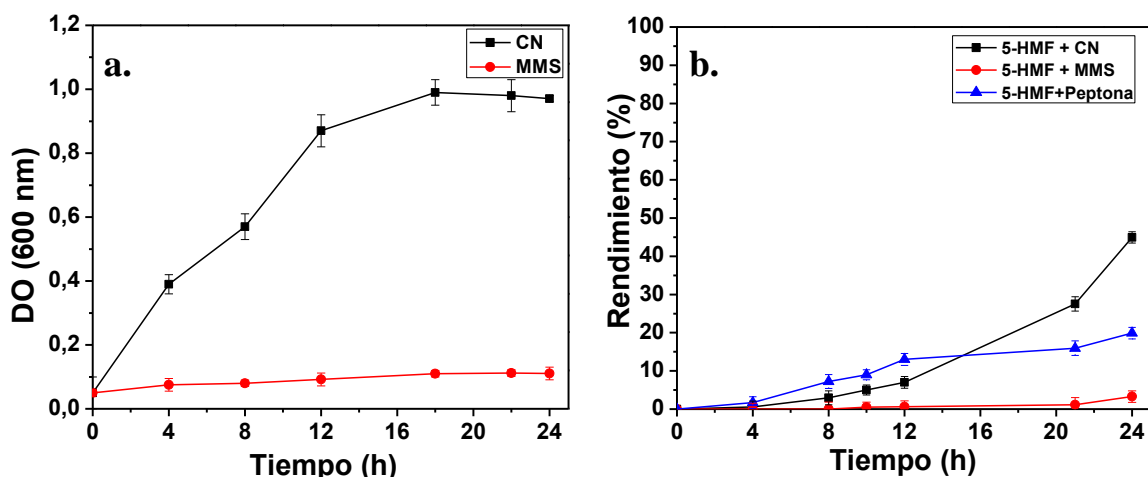


Figura 12. a) Efecto de los medios de cultivo en el crecimiento de *Serratia marcescens*. b) Efecto de los medios de cultivo en el rendimiento de HMFCa. Condiciones de reacción: 3 mM de 5-HMFp, temperatura=30 °C, pH=6,5, agitación=200 rpm. En el caso de la peptona se usó 1g L⁻¹.

Con la presencia de peptona en el medio de cultivo, se observó la formación de coloración roja, debida a la formación de pigmentos, que son característicos de algunos microorganismos gram-negativos como *Serratia marcescens* [60]. La coloración roja se presenta por la formación del pigmento conocido como prodigiosina, éste es un metabolito secundario, su formación se da en la fase exponencial [60–63]. La presencia de prodigiosina en el medio de cultivo se comprobó por espectrofotometría UV-Vis, donde la banda de mayor absorción se observó a 534 nm, dato que coincide con lo reportado en la literatura (figura 13) [54, 64]. En cuanto al uso de MMS como medio de cultivo, no se evidenció la formación de Prodigiosina.

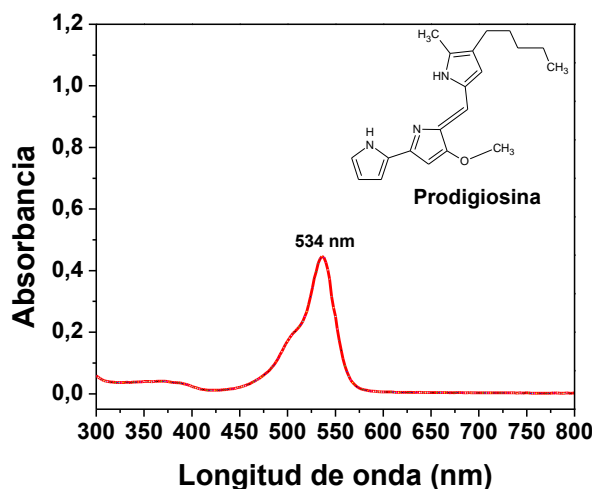


Figura 13. Espectro de absorción UV-Vis de la prodigiosina producida por *Serratia marcescens*.

Asimismo, se evaluaron 3 cosustratos diferentes como fuente alternativa de carbono para soportar el crecimiento de *Serratia marcescens* y determinar su efecto en la biosíntesis de HMFCa. Los cosustratos utilizados fueron fructosa, sacarosa y glucosa seleccionados de acuerdo a lo reportado por Su *et al.* y Zang *et al.*, al ser sustratos importantes en el crecimiento de *Serratia marcescens* [54,63]. Los resultados mostraron que, aunque las fuentes alternativas de carbono favorecieron el crecimiento, comparado con el observado en MMS (figura 14b), no hubo un efecto positivo en el rendimiento de HMFCa. En el caso de fructosa y sacarosa, el rendimiento de HMFCa fue similar al obtenido sin cosustrato (figura 14a). Por el contrario, cuando se usó glucosa como cosustrato la transformación de 5-HMF a HMFCa se vio desfavorecida, y el rendimiento no superó el 40%. Esta disminución en el rendimiento y el crecimiento con glucosa, posiblemente esté relacionado con la represión catabólica, lo que concuerda con lo observado por Su *et al.* y Rokade *et al.* [54,61]. De esta manera, se seleccionó MMS como medio de cultivo, descartándose el uso de caldo nutritivo y de cosustratos en la biosíntesis de HMFCa, para evitar la coloración por prodigiosina y, además, porque favorecer su producción no hace parte del objetivo de este trabajo.

Además, se observó acumulación de HMFCa en el medio de reacción; cuando no se usó cosustrato Sin embargo, el crecimiento observado con la presencia de cosustrato, probablemente se dio a expensas de la metabolización de la fuente alternativa de carbono, contrarrestando los efectos tóxicos que pueden generar los aldehídos furánicos y sus derivados en el crecimiento de algunos microorganismos [13].

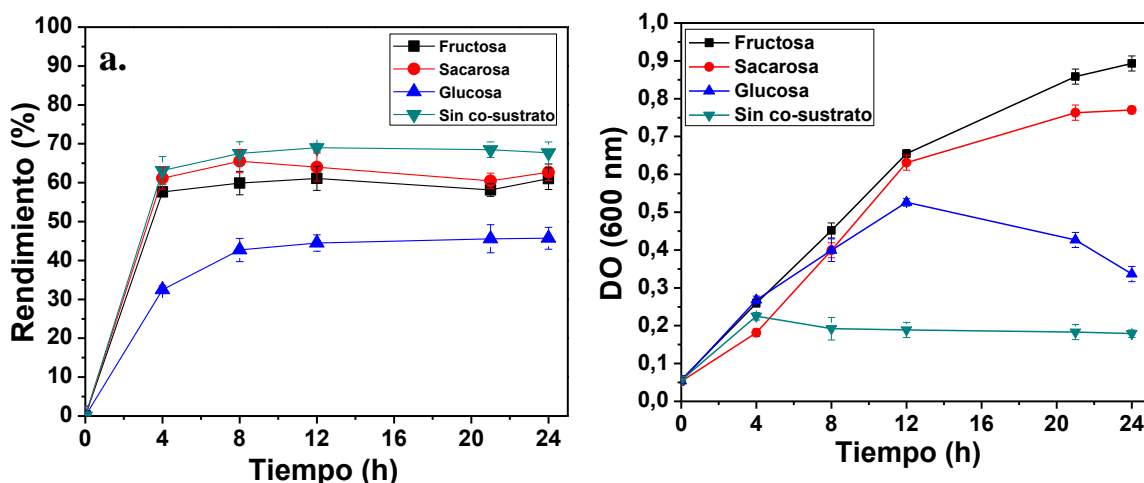


Figura 14. Efecto del uso de una fuente auxiliar de carbono en: a) Rendimiento de HMFCa y b) Crecimiento de *Serratia marcescens*. Condiciónes de reacción: MMS con 3 mM de 5-HMFp, D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=6,5, agitación=200 rpm, 5 g L⁻¹ de fructosa, sacarosa y glucosa.

3.2 Tolerancia de la cepa a 5-HMF (sustrato).

Con el fin de encontrar una fuente más económica de 5-HMF, se prepararon hidrolizados de fructosa, cuyo producto principal es 5-HMF. Para este proceso se usó Nb₂O₅ como catalizador, ya que contiene sitios ácidos de tipo Lewis, que favorecen la producción de 5-HMF [55]. El cromatograma típico de los hidrolizados de fructosa se muestra en la figura 15. En esta reacción, se obtienen 5-HMF y Furfural como productos principales con rendimientos de 76 % y 18 %, respectivamente. Además, se obtienen huminas y otros productos no identificados. Es importante mencionar que el 5-HMF obtenido a partir de la hidrólisis de la fructosa es usado sin purificación, lo que puede generar inhibición del crecimiento bacteriano.

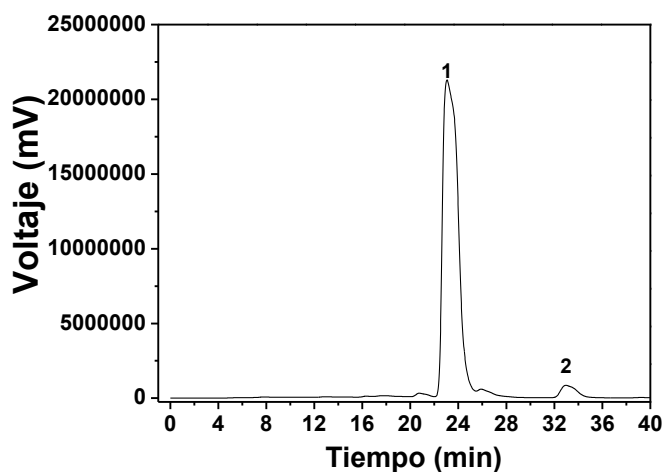


Figura 15. Cromatograma típico del hidrolizado de fructosa. 1) 5-HMF; 2) Furfural.

Una vez obtenidos los hidrolizados de fructosa, se evaluó la capacidad de producción de HMFCa de *Serratia marcescens* a partir de 5-HMFf. La figura 16 muestra la transformación de 5-HMFf en dos productos principales (HMFCa y FDCA con rendimientos de 69 % y 9 %, en 4 y 12 h, respectivamente), además de la formación de otro producto no identificado. En la figura 17, se muestra que la curva de crecimiento observada en *Serratia marcescens* con 5-HMFf, es típica de un crecimiento diaúxico. Este tipo de crecimiento tiene lugar cuando una bacteria crece en un medio con dos fuentes de carbono, una de las cuales se usa con preferencia frente a la otra [65,66]. En este caso, la bacteria creció primero a expensas de 5-HMF, y cuando este se agotó disminuyó su crecimiento, dándose en esta primera etapa de crecimiento el máximo rendimiento de HMFCa, que luego fue usado para reanudar su crecimiento exponencial. De esta forma, se tiene que la primera fase de crecimiento se dio a expensas de 5-HMFf y la segunda de HMFCa.

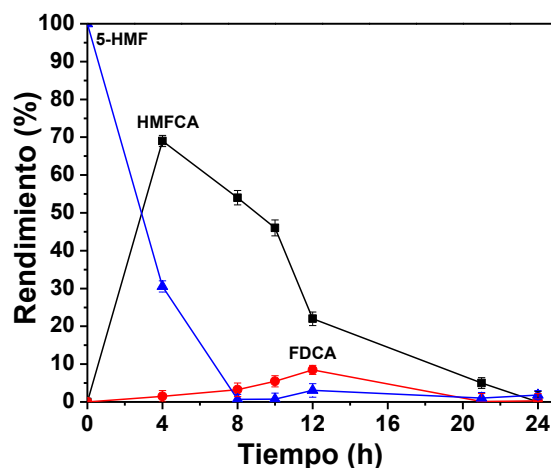


Figura 16. Reacción de transformación de 5-HMFf. Condiciones de reacción: MMS con 3 mM de 5-HMFP, D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=6,5, agitación=200 rpm.

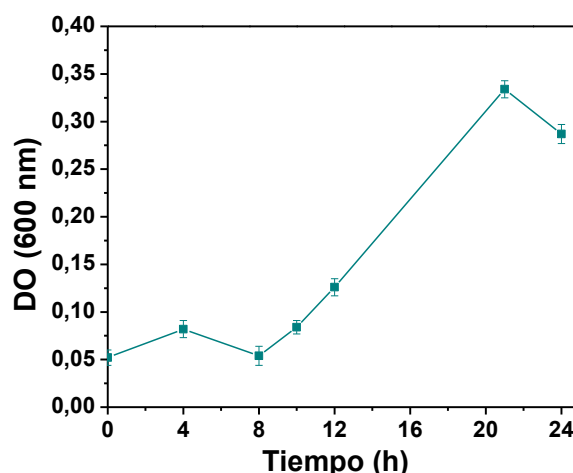


Figura 17. Crecimiento observado para *Serratia marcescens* en la reacción de transformación de 5-HMFf. Condiciones de reacción: MMS con 3 mM de 5-HMF, D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=6,5, agitación=200 rpm.

En la figura 16, también se muestra que una vez se consume totalmente 5-HMF y se da la máxima producción de HMFCa, éste se convierte a FDCA, por lo que se sugiere *S. marcescens* podría metabolizar 5-HMF a través del ciclo Trudgill según lo descrito por Koopman *et. al.* para *C. basilensis* HMF14 [52]. Esta ruta metabólica describe que 5-HMF se oxida primero a HMFCa, que posteriormente, por acción de oxidorreductasa específicas, se oxida a FDCA. Enseguida FDCA se descarboxila originando ácido furoico, que es convertido en ácido 2-oxo-glutárico para ser metabolizado a través del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (TCA) [15]. Aunque FDCA se observó en una pequeña proporción, y el ácido furoico no se evidenció en los medios de cultivo, se sugiere que se metabolizaron con tal eficiencia que no se produce una acumulación apreciable. En comparación con los resultados obtenidos cuando se usó 5-HMFp, no se observó acumulación de HMFCa en el medio, posiblemente porque en 5-HMFf hay otras fuentes de carbono que en pequeñas concentraciones ayudan al crecimiento de *Serratia marcescens*, e inducen a que también se metabolice HMFCa.

De esta manera, el nivel de tolerancia de *Serratia marcescens* a 5-HMFf fue evaluado, variando la concentración del mismo, debido a su alta toxicidad para los microorganismos [67]. Como se muestra en la figura 18a, la velocidad de reacción inicial más alta (aproximadamente $0,71 \text{ mM h}^{-1}$) se observó cuando la concentración de sustrato fue 3 mM, lo que sugiere que no existe inhibición en el crecimiento de *Serratia marcescens* como se evidenció en la figura 18b.

En concentraciones de 10 y 30 mM, las velocidades de reacción iniciales fueron bajas ($0,06$ y $0,07 \text{ mM h}^{-1}$, respectivamente), presentándose inhibición en el crecimiento a estas

concentraciones de sustrato y, asimismo, bajos rendimientos hacia HMFCa (2,5 y 1,0 %, respectivamente (ver anexo figura A1)). La inhibición en el crecimiento a concentraciones superiores a 3 mM (figura 18b), se da por la presencia de compuestos como furfural en los hidrolizados de fructosa, que puede llegar a ser más tóxico que 5-HMF [9]. En comparación con *Comamonas testosteroni* SC1588 que fue capaz de oxidar 5-HMF a HMFCa [46], *Serratia marcescens* solo pudo tolerar una concentración de 3 mM de sustrato, con la ventaja de que fue capaz de oxidar 5-HMF que representa una fuente económica para la obtención de HMFCa.

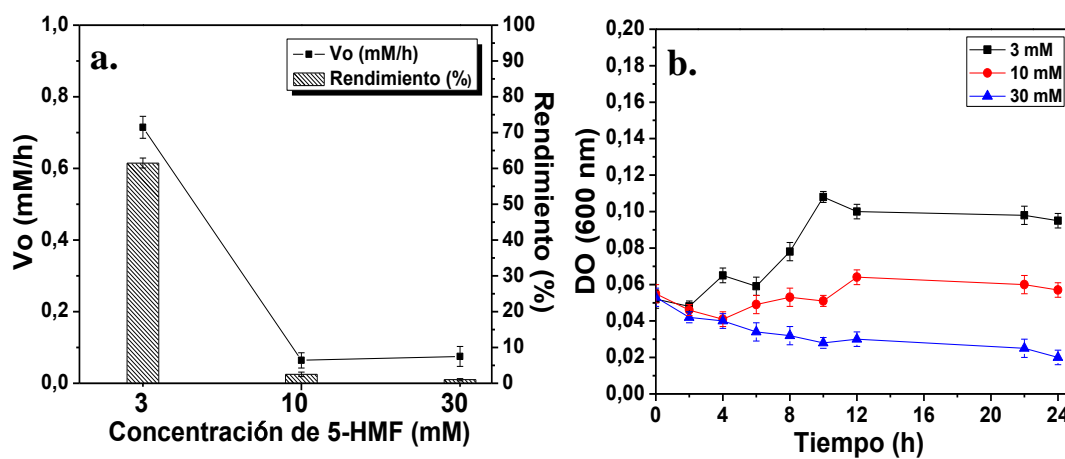


Figura 18. Efecto de la concentración de 5-HMF en: a) la síntesis de HMFCa y b) Crecimiento de *Serratia marcescens*. Condiciones de reacción: D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=6,5, agitación=200 rpm, MMS con 3, 10 y 30 mM de 5-HMF con 4 horas de reacción. Donde: V_o es la velocidad inicial de reacción en mM h^{-1} .

También, se evaluó el nivel de tolerancia de *Serratia marcescens* a 5-HMFp. Como se muestra en la figura 19a, aunque la velocidad inicial de reacción (V_o) más baja ($0,63 \text{ mM h}^{-1}$) se presentó cuando la concentración de sustrato fue 3 mM, se obtuvo un rendimiento hacia HMFCa del 85 % en 4 horas (ver anexo figura A2). Sin embargo, la velocidad inicial de reacción más alta ($1,86 \text{ mM h}^{-1}$) se dio cuando la concentración de 5-HMF fue 30 mM, aunque con un rendimiento de 25 % hacia HMFCa en 4 horas, lo que indicó que se presentó inhibición del crecimiento de *S. marcescens* a esta concentración (figura 19b), necesitando de mucho más tiempo de reacción (21 h) para alcanzar el máximo rendimiento (67 %), en comparación con los requeridos para las concentraciones de 3 y 10 mM (10 y 12 h, respectivamente). De la misma manera, los resultados mostraron que, con concentraciones de 50 y 100 mM, también se presentó inhibición en el crecimiento obteniéndose rendimientos bajos hacia HMFCa (6,8 y 2 %, respectivamente en 4 horas), aunque las velocidades iniciales de reacción fueron de aproximadamente $1,82$ y $0,99 \text{ mM h}^{-1}$.

Además, se observó que la velocidad inicial de reacción cuando se usó 5-HMFf es dependiente de la concentración del mismo, posiblemente debido a que los otros compuestos presentes en 5-HMFf inhiben más el crecimiento en comparación con el observado cuando se usó 5-HMFp.

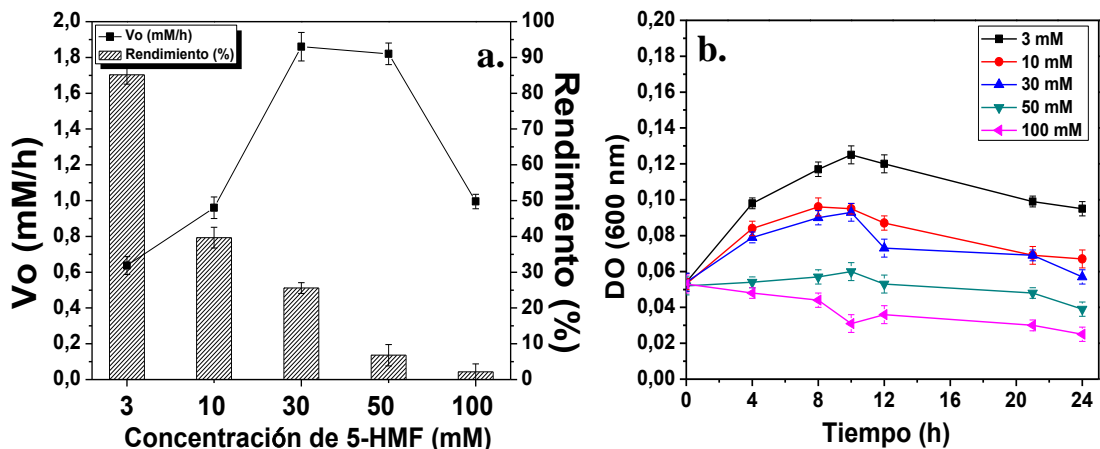


Figura 19. Efecto de la concentración de 5-HMFp en: a) la síntesis de HMFCa y b) Crecimiento de *Serratia marcescens*. Condiciones de reacción: D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=6,5, agitación=200 rpm, MMS con 3, 10, 30, 50 y 100 mM de 5-HMF con 4 horas de reacción. Donde: V_o es la velocidad inicial de reacción en mM h^{-1} .

3.3 Efecto de las condiciones de reacción en la producción de HMFCa

Mejorar las condiciones de reacción es importante en los procesos de fermentación [68]. Por lo tanto, se evaluó el efecto de la D.O. inicial en un rango entre 0,05 y 0,30. Como se muestra en la figura 20, con una D.O. inicial de 0,30 se obtuvo un rendimiento de HMFCa del 81 % en 2 horas de reacción, con una productividad de $0,40 \text{ mM HMFCa mM 5-HMF}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que cuando la D.O. fue 0,10, la productividad fue $0,21 \text{ mM HMFCa mM 5-HMF}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con un rendimiento para HMFCa del 84% en 4 horas. La productividad más baja ($0,17 \text{ mM HMFCa mM 5-HMF}^{-1} \text{ h}^{-1}$), se obtuvo cuando la D.O. inicial fue 0,05 con un rendimiento de 68% en 4 horas. Estos resultados mostraron que a mayor D.O. mayor productividad del proceso. Sin embargo, con el fin de evaluar el efecto de las otras variables se usó una D.O. inicial de 0,05, para poder determinar si presentaban un efecto significativo en la disminución del tiempo de reacción.

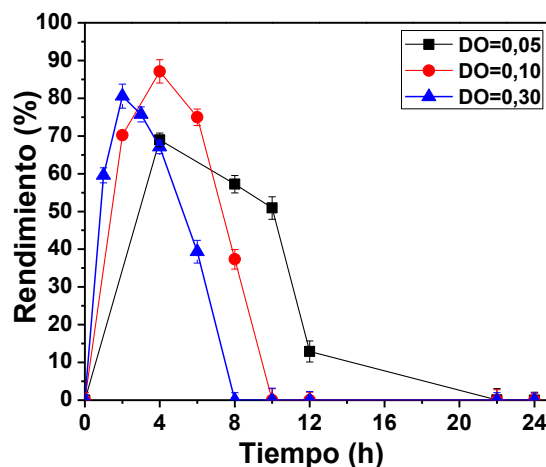


Figura 20. Influencia de la D.O. inicial en el rendimiento hacia HMFCa. Condiciones de reacción: MMS con 3 mM de 5-HMFf, temperatura=30 °C, pH=6,5, agitación=200 rpm.

El efecto del pH se determinó dentro de un rango de pH de 5,0 a 8,0 de acuerdo con lo previamente reportado en literatura para *S. marcescens* [69,70]. La Figura 21a muestra que, a pH 5 y pH 8, disminuyó el rendimiento hacia HMFCa en comparación con el obtenido a pH 6.5 a las 4 h. Se obtuvo un bajo rendimiento a pH 5 debido probablemente a que la formación de este compuesto aumentó la acidez del medio, inhibiendo el crecimiento de *Serratia marcescens* (figura 21b) y generando una transformación más lenta de 5-HMF a HMFCa. De esta manera, para obtener el máximo rendimiento de HMFCa (54 %) a pH 5 se necesitó de 10 horas de reacción, mientras que a pH 8 se necesitó de 4 horas de reacción para obtener un rendimiento del 62 %.

A pH 6,5 y 8, se observó un comportamiento similar en cuanto al crecimiento, que en la etapa inicial disminuyó, y luego aumentó a las 4 horas, tiempo en el cual se obtuvo el máximo rendimiento de HMFCa. Esta disminución en el crecimiento, pudo ser debida a el acondicionamiento inicial de la bacteria al medio, por la presencia de otros compuestos presentes en el 5-HMFf. Los resultados observados para el crecimiento concuerdan con la literatura, ya que se ha mostrado que *Serratia marcescens*, es capaz de crecer en rangos de pH de 6 a 8 [69,70].

En este trabajo utilizando *Serratia marcescens* se reportaron rendimientos para HMFCa de 68 y 62 %, a pH 6,5 y 8, respectivamente, en 4 horas de reacción a partir de 5-HMF presente en hidrolizados de fructosa. Es importante mencionar, que el uso de hidrolizados de fructosa, sin ningún proceso de purificación, representa una opción económica para la obtención de compuestos de alto valor agregado. Aunque los rendimientos obtenidos con *Comamonas testosteroni* SC1588 fueron superiores (94-92 %, a pH 7 y 8, respectivamente), se necesitó de 11 horas de reacción y 5-HMF puro [46].

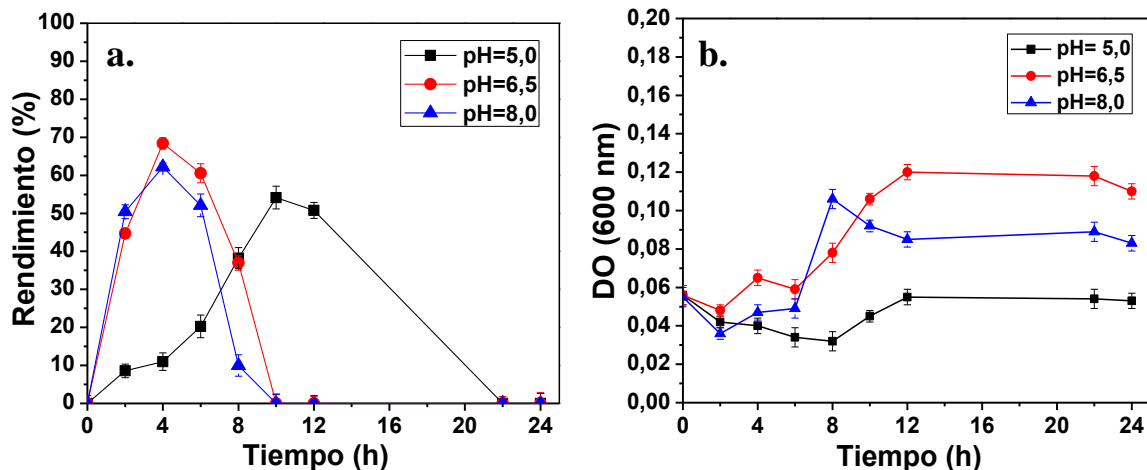


Figura 21. Influencia del pH en: a) Rendimiento hacia HMFC y b) Crecimiento de *Serratia marcescens*. Condiciones de reacción: MMS con 3 mM de 5-HMf, D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, agitación=200 rpm.

Se evaluó el efecto de la temperatura en la obtención de HMFC en el rango de 25 a 35 °C, este rango fue seleccionado porque se ha indicado en literatura que *S. marcescens* crece en este rango de temperatura [69,70]. Los resultados mostraron que cuando la temperatura fue 30 °C, se obtuvo un rendimiento del 69 % en 2 horas, mientras que cuando la temperatura fue 35 °C, el rendimiento fue del 67 % en 4 horas (figura 22a).

El máximo rendimiento (87 %) se dio a 25 °C, aunque se necesitó de más tiempo de reacción (6 h), puesto que como se observa en la figura 22c, el crecimiento de *Serratia marcescens* fue bajo en comparación con el observado cuando las temperaturas fueron 30 y 35 °C. Sin embargo, la formación de FDCA se favoreció a 35 °C con un rendimiento del 15 % en 12 h de reacción (figura 22b).

De este modo, se determinó que la temperatura afectó el tiempo de reacción necesario para obtener HMFC, en donde, a 25°C se observó una disminución del crecimiento de *S. marcescens* que se vio reflejado en un aumento del tiempo de reacción, comparado con el necesario para conseguir los mismos rendimientos cuando las temperaturas fueron 30 y 35 °C.

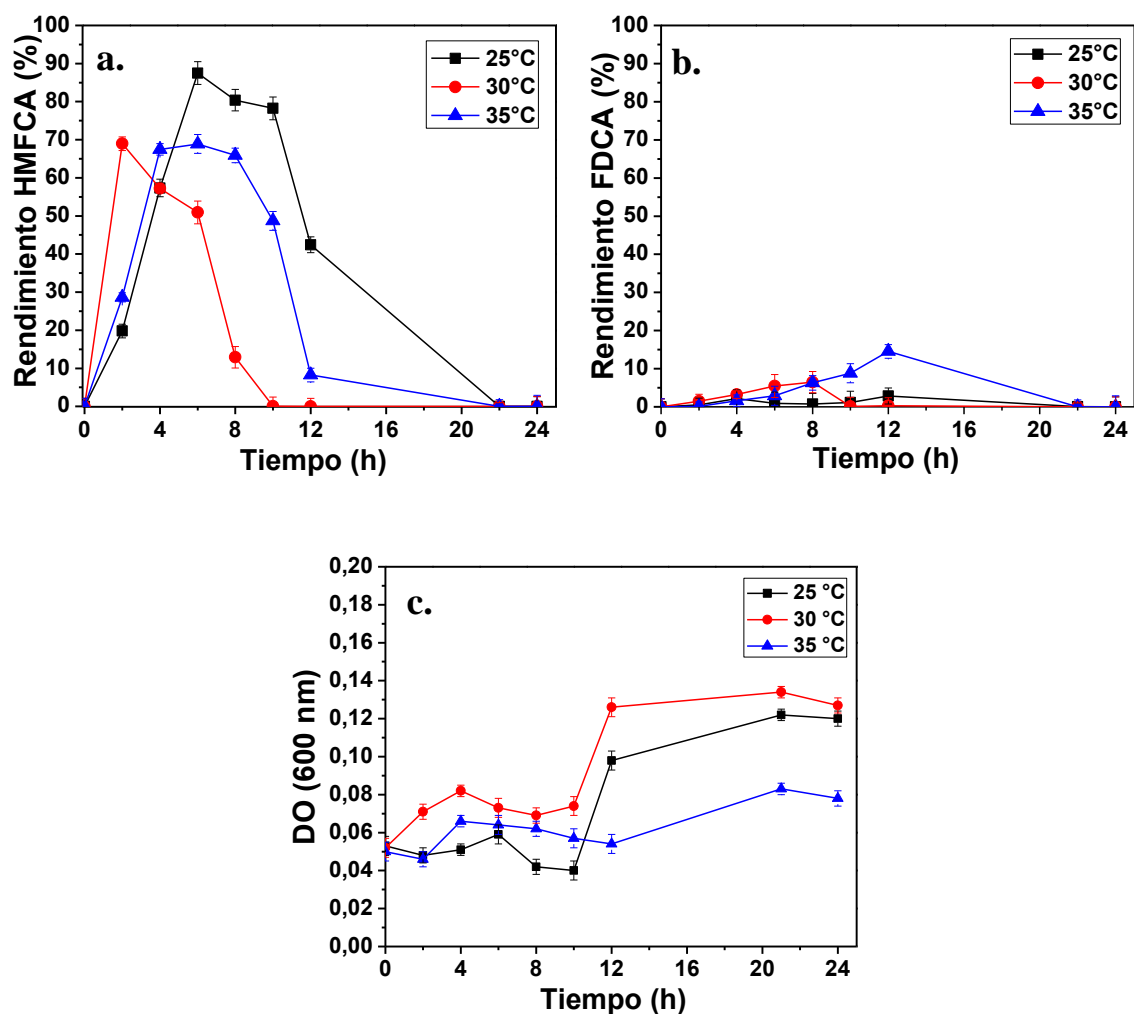


Figura 22. Influencia de la temperatura en: a) Rendimiento hacia HMFCA, b) Rendimiento hacia FDCA y c) Crecimiento de *Serratia marcescens*. Condiciones de reacción: MMS con 3 mM 5-HMFF, D.O. inicial=0,05, pH=6,5, agitación=200 rpm.

3.3.1 Optimización de las condiciones de reacción para obtener HMFCA

Las condiciones de reacción temperatura y pH se evaluaron en conjunto con la concentración de 5-HMFF para determinar las condiciones óptimas de la biosíntesis de HMFCA. Estas condiciones se obtienen mediante el uso de diseños experimentales como el diseño Box-Behnken (DBB) [71]. De esta manera, el modelo de regresión polinomial para el rendimiento de HMFCA a 4 horas se encuentra en la ecuación 3:

$$\text{Rendimiento HMFCA (\%)} = 95,8 - 1,82A - 2,97B - 5,776C + 0,048AA + 0,643BB + 0,146CC - 0,078AB - 0,011AC - 0,125BC$$

Ecuación (3)

El modelo se validó mediante el análisis de varianza (ANOVA). Este explicó, de manera efectiva, la variabilidad de los datos para el rendimiento de HMFCa, donde los valores de R^2 fueron 0,996, con un nivel de confianza del 95 %. La adecuación del modelo ajustado también se evaluó utilizando la prueba F. Para esto, se comparó el valor F calculado con el valor F tabulado en un nivel de confianza alto, para obtener una buena predicción del modelo. La tabla 8 muestra que el valor de F calculado fue mayor que el valor de F tabulado por lo que se rechaza la hipótesis nula con un nivel de significancia del 95%, es decir, el modelo es adecuado para predecir el rendimiento de HMFCa. En la tabla 9, se presentan las condiciones óptimas para el rendimiento de HMFCa.

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA)

Fuentes	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F valor	F _{0.05,1}
Rendimiento HMFCa ($R^2 = 0,996$)					
Regresión	1	18363,1	18363,1	7592,03	4,67
Residual	28	67,7	2,4	-	-
Total	29	18430,8	-	-	-

Tabla 9. Condiciones óptimas predichas y observadas para el rendimiento de HMFCa.

Variables			Rendimiento HMFCa (%)		Error (%)
A (°C)	B	C (mM)	Predicho	Observado	
30	8,0	3,0	63,5	63,1	0,63

En la figura 23, se comparan los rendimientos de HMFCa predichos por el diseño Box-Behnken con los rendimientos observados experimentalmente. Los resultados mostraron que tanto los valores predichos como los observados se dispersaron cerca de la línea recta, dándose así una correlación satisfactoria ($R^2 = 0,996$). Además, la importancia de las variables de proceso, términos lineales, cuadráticos e interacciones, se observan en el gráfico de Pareto. El coeficiente con menor valor de p indica que este es más significativo hacia la respuesta [72]. El gráfico de Pareto, mostrado en la figura 24, indica que la concentración de 5-HMF fue el factor que influyó más significativamente en el rendimiento de HMFCa, aunque el pH y la temperatura también presentaron un efecto significativo sobre el mismo. Con un valor p mayor a 0,05, se confirmó que las interacciones temperatura, concentración (A,C) y temperatura, pH (A,B) no tuvieron una influencia significativa en el rendimiento de HMFCa (ver anexo tabla A3).

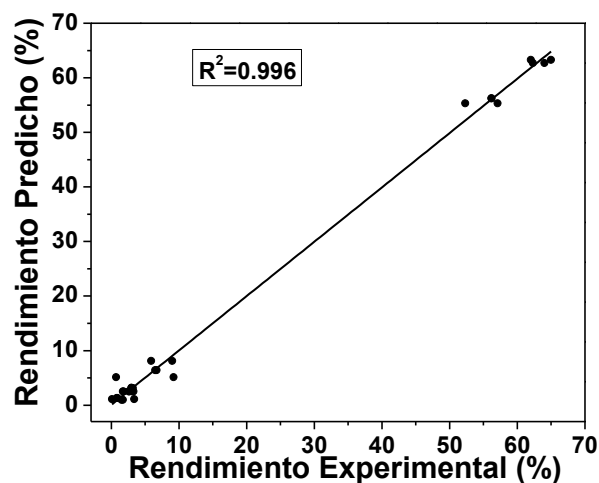


Figura 23. Línea ajustada: Rendimiento experimental vs. rendimiento predicho para HMFCA.

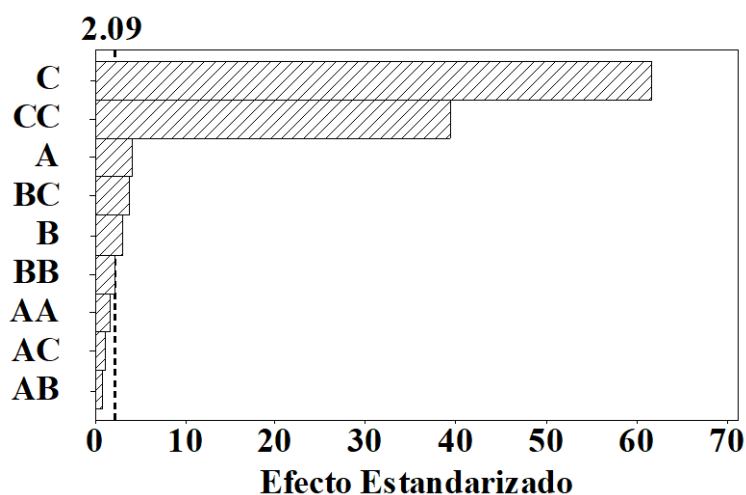
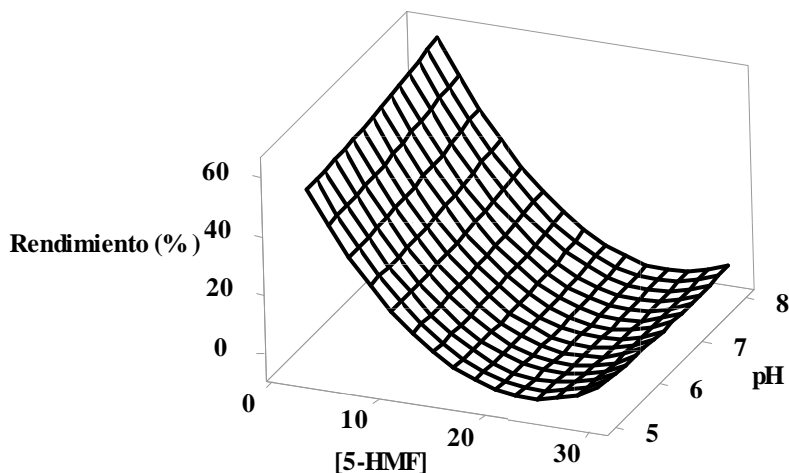


Figura 24. Pareto de los efectos para el rendimiento de HMFCA. Donde: A= temperatura, B=pH y C= concentración de 5-HMFF.

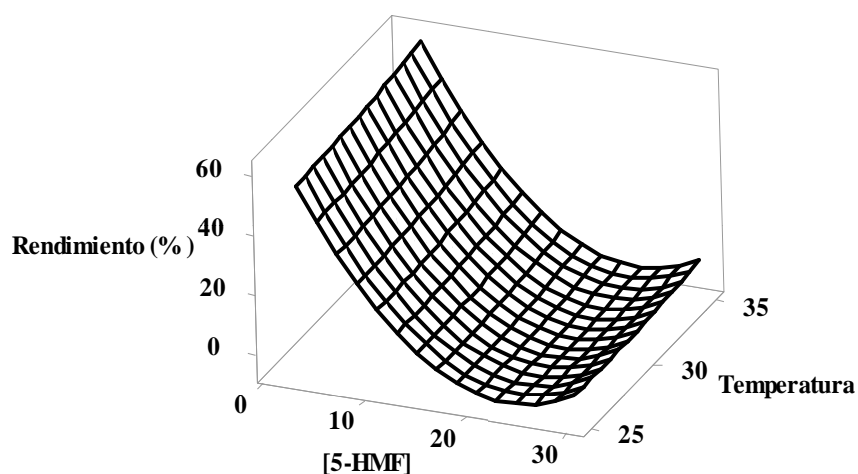
En la figura 25 se presentan los diagramas tridimensionales de superficie, en donde se relaciona el pH, temperatura y concentración de 5-HMFF. Las gráficas se obtuvieron modificando dos variables y manteniendo una de ellas en su nivel medio. En la figura 25a, se evidenció que el rendimiento de HMFCA aumentó levemente con valores bajos de concentración de 5-HMF cuando el pH fue 8. La figura 25b muestra que el rendimiento de HMFCA fue bajo, cuando la concentración de 5-HMF fue 30 mM y la temperatura de reacción 25 °C, mientras que, cuando la temperatura de reacción fue 35 °C, el rendimiento de HMFCA aumentó ligeramente. La figura 25c muestra que el rendimiento de HMFCA aumentó cuando los valores de temperatura de reacción y pH fueron 35 °C y 8,

respectivamente. De esta manera, se pudo observar que los mejores rendimientos para HMFCa, se obtuvieron a bajas concentraciones de 5-HMF y pH altos, es decir 3 mM de 5-HMF y pH = 8. Esto fue debido a la presencia de otros compuestos en el medio de cultivo (huminas y Furfural), y a un aumento de la acidez del medio por la formación de HMFCa, factores por los que posiblemente se observó bajos rendimientos, cuando las concentraciones de 5-HMF fueron altas y el pH bajo.

a.



b.



C.

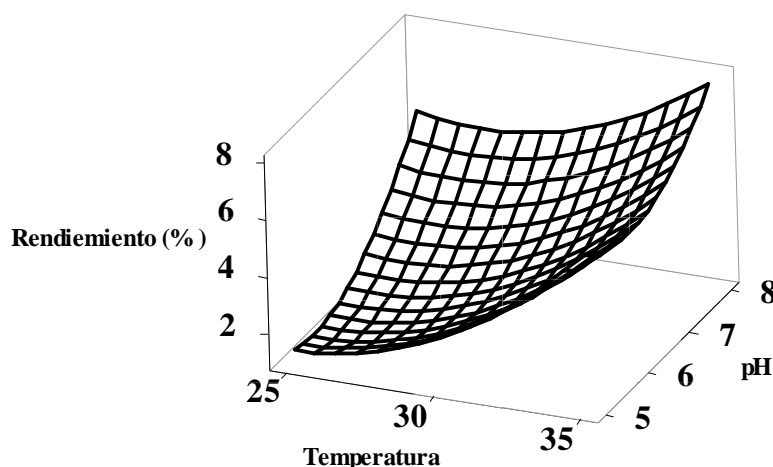


Figura 25. Gráficos de superficie tridimensionales para el rendimiento de HMFCa (%) a) [5-HMF], pH; b) [5-HMF], Temperatura y c) Temperatura, pH.

3.4 Identificación de los genes involucrados en la biotransformación de 5-HMF

3.4.1 Búsqueda de genes y diseño de oligonucleótidos

Como resultado de la búsqueda en literatura, se encontraron los siguientes genes implicados en la transformación de 5-HMF: el transportador principal de la superfamilia de facilitadores 1, HMF/furfural oxidorreductasa en *Cupriavidus basilensis* HMF14 [17], oxidorreductasa en *Serratia nematodiphila* [73], 5-carboximetil-2-hidroximucinato delta-isomerasa en *Serratia marcescens* FS14 [74], aldehído deshidrogenasa, la proteína de degradación 4-hidroxifenilacetato, piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasa y el componente 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa en *Serratia marcescens* DB11 [75].

Del anterior listado, solo tres genes alinearon con 100 % de identidad en el genoma de *Serratia marcescens*, los demás alinearon con porcentajes de identidad menores al 50 %. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una aldehído-deshidrogenasa (tamaño esperado del producto 636 pares de bases (pb)), un transportador principal de la superfamilia de facilitadores (tamaño esperado del producto 619 pb) y una piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasa (tamaño esperado del producto 671 pb) (tabla 10). Además, de la elección por un alineamiento con un 100 % de identidad, la aldehído deshidrogenasa se seleccionó porque su presencia conlleva a la formación del alcohol (2,5-bis(hidroximetil)furano (BHMF)), que es el producto derivado de la reducción de 5-HMF y su metabolización se da a través del ciclo de Trudgill [7,17]. En el caso del transportador principal de la superfamilia de facilitadores, fue seleccionado porque actúa como bomba de transporte que evita el ingreso y acumulación de compuestos tóxicos en el interior de la célula, permitiendo altos

niveles de tolerancia a los mismos [76]. La familia de las piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa se seleccionó porque está relacionada con el estrés oxidativo que pueden generar compuestos como 5-HMF en *Saccharomyces cerevisiae*, presentando bajos niveles de tolerancia al mismo [77].

Tabla 10. Cebadores usados en este trabajo.

Nombre de la proteína	Número de accesión	Nombre de los cebadores	Secuencia de los cebadores (5' a 3')	Ref.
Aldehído deshidrogenasa	CDG13927.1	ADLeft	5' CGAAGAGATGGCTTCGGTATT -3'	[75]
		ADRight	5' GTCCCACCGGTAAAGGAGAT -3'	
Transportador principal de la superfamilia de facilitadores	CP013913.1	MFTLeft	5' TTAACCTCCATCAACGTCAGTG -3'	[17]
		MFTRight	5' TAAACAGACCGGTTTGCTGAGT-3'	
Piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa	CP013913.1	ORLeft	5' CAGCGTGGTGATGATTGAAG -3'	[75]
		ORRight	5' GCAGATCCTGATAGCGGATAA -3'	

3.4.2 Identificación de los genes involucrados en la biotransformación de 5-HMF mediante PCR

De los tres genes analizados, uno amplificó dando una banda correspondiente al tamaño esperado del producto (671 pb), que corresponde con el gen que codifica para la enzima piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa (figura 26), la cual probablemente esté implicada en el proceso de oxidación de 5-HMF. No se observó amplificación de la banda correspondiente al gen que codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa, lo cual puede estar relacionado con ausencia de BHMF en el medio de reacción. Utilizando cromatografía de gases acoplada a masas no fue identificado este producto. Respecto a la ausencia de banda para el transportador principal de la superfamilia de facilitadores, esto puede relacionarse con el hecho que *Serratia marcescens* transforma 5-HMF y no solo tolera este compuesto. La presencia de este gen solo permitiría que el microorganismo tolerara 5-HMF sin transformarlo.

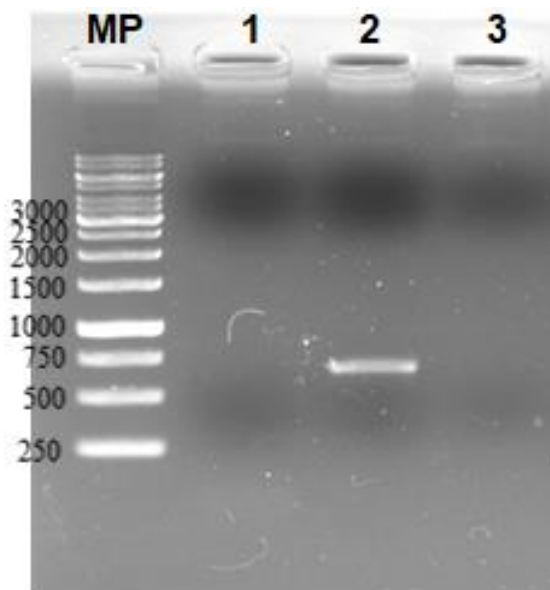


Figura 26. Confirmación de la presencia de la piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasa en *Serratia marcescens*. MP: Marcador de peso. Amplificación de la piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasa: 1) Control negativo (agua). 2) ADN *Serratia marcescens*. 3) ADN *Bacillus cereus*.

✓ Las piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasas.

Las piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasas forman parte de la familia de las flavoproteínas con residuos de cisteína en el sitio activo redox [78-80]. Específicamente dentro de esta familia de enzimas, la glutatión reductasa es la directamente implicada en el proceso de estrés oxidativo. El estrés oxidativo se genera cuando se agotan los niveles de GSH (glutatión en forma reducida) y se acumulan especies reactivas de oxígeno [81]. La glutatión reductasa utiliza FAD como grupo prostético y NADH para reducir un equivalente molar de disulfuro glutatión (GSSG) a dos equivalentes molares de GSH, por acción de sulfhidrilos presentes en el sitio activo redox [82]. Probablemente en 5-HMF por ser un electrófilo reactivo con los grupos tiol [81], el grupo carbonilo compita con GSSH por la unión a los grupos sulfhidrilo del sitio activo, impidiendo la formación de GSH, con acumulación de especies reactivas de oxígeno y favoreciendo la formación de HMFCa. Son estas especies reactivas de oxígeno, las que impiden el crecimiento ocasionando muerte celular. Posiblemente también este involucradas en este proceso las glutatión peroxidasas, generado acumulación de peróxido de hidrógeno, que puede ser el responsable de la oxidación de 5-HMF y HMFCa. De hecho, algunas glutatión peroxidasas aisladas en otros microorganismos [83,84] actúan fisiológicamente a 30 °C y pH 8 [85,86], lo que puede deberse a que a estas condiciones se favorece la presencia de NADH, cofactor indispensable para la actividad catalítica de este tipo de enzimas [87]. La muerte celular ocasionada, se da

por el agotamiento de NADH que debió ser usado para combatir las especies reactivas de oxígeno y para la oxidación de 5-HMF por enzimas dependientes del mismo, evitando así que el sistema de defensa antioxidante funcione [88].

En este sentido, se varió el pH a 8, con el fin de determinar si estas enzimas son dependientes de NADH. Como se muestra en la figura 27a, fue posible obtener la velocidad inicial de reacción más alta cuando la concentración de 5-HMFf fue 3 mM ($0,75 \text{ mM h}^{-1}$). *S. marcescens* fue capaz de transformar más rápido y en mayor cantidad 5-HMF, cuando se expuso a una concentración de 3 mM. Cuando la concentración fue 10 mM, se presentó una velocidad inicial de reacción de $0,28 \text{ mM h}^{-1}$, aunque con un rendimiento de 28 % hacia HMFCa en 4 horas, lo que indicó que hay inhibición moderada del crecimiento de *S. marcescens* a esta concentración (figura 27b), por el estrés oxidativo que genera 5-HMF, pero que se puede contrarrestar con el uso de pH 8.

En la figura 27b se observó que la concentración de 30 mM fue tóxica para esta cepa, debido a la presencia de otros compuestos en el medio de cultivo que inhibieron el crecimiento de *S. marcescens*. El mayor rendimiento (95 %) se obtuvo a las 4 h de reacción con una concentración 3 mM de 5-HMFf, seguido por un 79 % de rendimiento hacia HMFCa a las 12 h de reacción con una concentración de 10 mM (ver anexo figura A3a). Asimismo, se observó una reducción significativa del rendimiento de HMFCa (7 % a las 22 h) a una concentración de 30 mM (figura 26). En comparación con los resultados obtenidos a pH 6.5 (figura 18), se obtienen mejores rendimientos puesto que a pH 8, se favorece la presencia de NADPH, cofactor esencial para la actividad catalítica de las piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa, mientras que a pH 6,5 se favorece la presencia de NAD^+ [87].

Además, se determinó que el cambio de pH favoreció la producción de FDCA obteniendo un rendimiento máximo de 20% en 8 h, con una concentración de 3 mM de 5-HMFf (figura A3b), posiblemente por la presencia de otro tipo de enzimas dependientes de NADPH que oxiden HMFCa a FDCA o por la posible acumulación de peróxido de hidrógeno. En este trabajo, el rendimiento de FDCA fue menor en comparación con los reportados para una Lipasa B inmovilizada de *Candida antártica* [3] y para *Methylobacterium radiotolerans* G-2 [89] (~98 % de rendimiento), usando hidrolizados ácidos de algas y 5-HMF puro. En este contexto, los hidrolizados de fructosa representarían una fuente económica e importante para la obtención y transformación de 5-HMF en compuestos de alto valor agregado como HMFCa y FDCA.

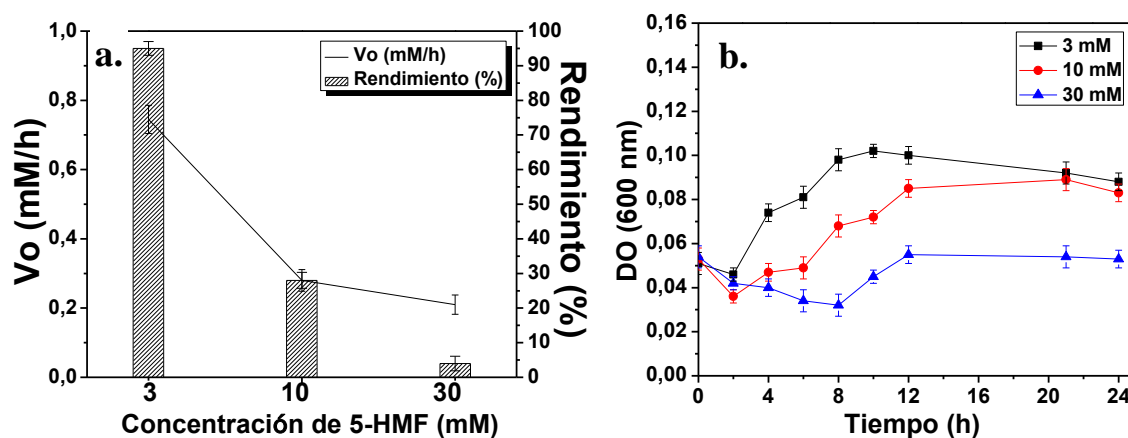


Figura 27. Efecto de la concentración de 5-HMF en; a) síntesis de HMFC y b) Crecimiento de *Serratia marcescens*. Condiciones de reacción: D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=8, agitación=200 rpm, MMS con 3, 10 y 30 mM de 5-HMF con 4 horas de reacción. Donde: Vo es la velocidad inicial de reacción en mM h⁻¹.

3.5 Biosíntesis por fermentaciones en lote alimentado de 5-HMF

Una vez identificado un posible mecanismo de reacción, para incrementar la concentración de HMFC en el medio de cultivo y evitar su degradación, se utilizó la estrategia en lote alimentado con control de la concentración del sustrato. Los resultados mostraron que a las 20 horas fue posible obtener la mayor cantidad de HMFC (790,2 mg L⁻¹). Después de este tiempo se evidenció la acumulación de HMFC y 5-HMF (figura 28a). Como posible explicación a esto, se tiene que tanto HMFC como 5-HMF en altas concentraciones y la presencia de otros compuestos en los hidrolizados de fructosa (huminas y furfural), pueden ser tóxicos para la bacteria, generando estrés oxidativo e inhibiendo el crecimiento de las mismas (figura 28b) y, por lo tanto, la degradación de 5-HMF. Aunque Koopman *et al.* obtuvieron una mayor concentración de HMFC (6700 mg L⁻¹ en 55 h) con la estrategia en lote alimentado, usaron una cepa de *Pseudomonas putida* S12 modificada genéticamente, para biotransformar 5-HMF a FDCA [7].

Comparado con otros estudios, este trabajo presenta tiempos de reacción más cortos (20 h), no utiliza microorganismos genéticamente modificados y su objetivo principal es la obtención de HMFC utilizando la estrategia en lote alimentado, además, presenta la utilización de hidrolizados de fructosa sin purificación como fuente de 5-HMF, que representan una fuente económica para la obtención de 5-HMF.

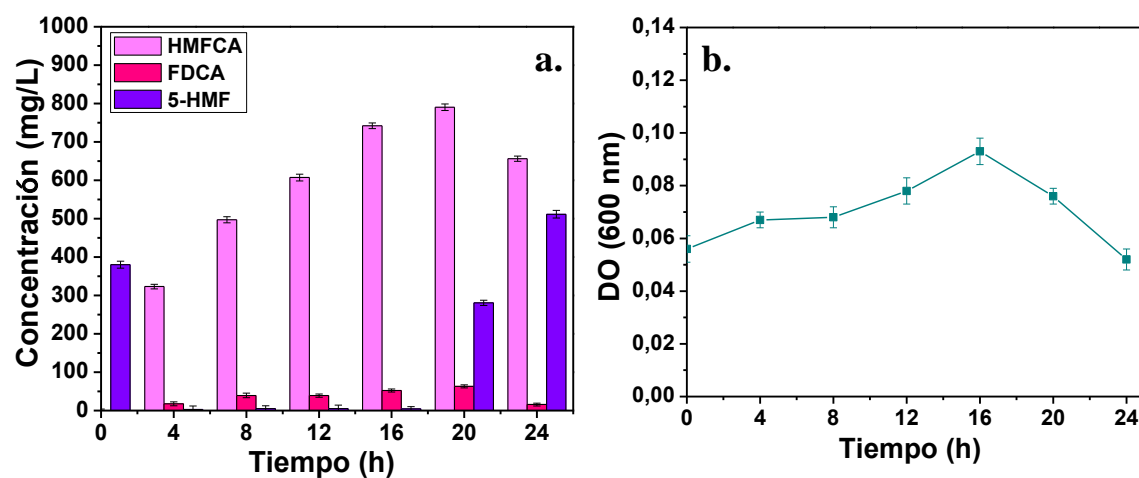


Figura 28. a) Biosíntesis de HMFCa por la estrategia en lote alimentado y b) Crecimiento de *Serratia marcescens*. Condiciones de reacción: MMS con 3 mM de 5-HMF, D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=8, agitación=200 rpm. 5-HMF fue alimentado cada 4 horas.

4 CONCLUSIONES

- Se aisló de residuos de bagazo de caña una cepa bacteriana del género *Serratia*, capaz de metabolizar y oxidar 5-HMF con la obtención de HMFCa como producto principal.
- Se determinó el nivel de tolerancia de *Serratia marcescens* a 5-HMF puro y presente en hidrolizados de fructosa. Cuando 5-HMF fue puro *S. marcescens* fue capaz de tolerar 30 mM, presentando inhibición en su crecimiento (rendimientos del 25 % en 4 horas), mientras que, cuando 5-HMF está presente en hidrolizados de fructosa *S. marcescens* solo fue capaz de tolerar una concentración de 3 mM de 5-HMF, sin presentar inhibición en su crecimiento.
- Se obtuvo rendimientos entre 61 % y 87 %, con una D.O. inicial de 0,1, pH 6.5 y 25 °C de temperatura. De igual manera, con el uso del diseño Box-Behnken, se determinó que las condiciones óptimas para la obtención de HMFCa a partir de hidrolizados de fructosa y en 4 horas de reacción, fueron 30 °C, pH 8 y una concentración de 5-HMF de 3 mM.
- Se realizó una aproximación a la identificación de la presencia de la piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa, posible responsable de la transformación de 5-HMF a HMFCa en *S. marcescens*.
- La optimización de las condiciones de biosíntesis de HMFCa, usando hidrolizados de fructosa, demuestra que se puede usar *Serratia marcescens* en la biodetoxificación de hidrolizados lignocelulósicos, debido a su capacidad de oxidar y tolerar 5-HMF. De esta manera, con el uso de la estrategia en lote alimentado (Fed-batch) con control de la concentración de sustrato, fue posible obtener 790,2 mg L⁻¹ de HMFCa.

5 RECOMENDACIONES

- Realizar la evolución adaptativa de esta cepa, ya que esta podría ayudar y garantizar que la cepa sea capaz de tolerar concentraciones más altas de 5-HMF.
- Desarrollar un proceso de alimentación de 5-HMF continuo, con tiempos de residencia entre 2 y 4 horas, para evitar la degradación de HMFCa y generar un proceso de gran eficiencia con altos volúmenes.
- Obtener los extractos enzimáticos para su purificación y caracterización, y además, determinar la actividad enzimática de los mismos.
- Analizar la expresión y producción de las enzimas piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasas presentes en *Serratia marcescens* que posiblemente oxiden 5-HMF a HMFCa.

6 ANEXOS

Tabla A1. Factores de respuesta para el sustrato y productos obtenidos de la oxidación biocatalítica de 5-HMF. Estos fueron calculados por el detector UV.

Compuesto químico	Factor de respuesta
5-HMF	53438
HMFCa	11492
FDCA	29000
FURFURAL	9974

➤ Resultados obtenidos en el análisis del diseño

Tabla A2. Datos experimentales y valores predichos para el rendimiento de HMFCa.

Corrida	Réplica	Variables			Rendimiento HMFCa (%)	
		A	B	C	Experimental	Predicho
1	1	25	6,5	30,0	3,0	3,3
2	1	35	6,5	3,0	3,1	2,5
3	1	35	5,0	16,5	62,0	63,1
4	1	30	6,5	16,5	3,3	2,5
5	1	30	5,0	3,0	9,2	5,3
6	1	25	8,0	16,5	56,2	56,2
7	1	30	8,0	3,0	57,1	55,1
8	1	30	5,0	30,0	3,2	3,1
9	1	30	6,5	16,5	6,5	6,2
10	2	30	8,0	3,0	1,5	1,1
11	1	30	6,5	16,5	2,6	2,5
12	2	25	8,0	16,5	56,2	56,2
13	1	25	6,5	3,0	1,7	2,5
14	2	30	5,0	3,0	0,9	0,9
15	1	35	6,5	30,0	3,1	3,1
16	2	35	5,0	16,5	0,1	1,2
17	1	30	8,0	30,0	5,9	7,9
18	2	30	6,5	16,5	3,4	1,2
19	2	25	6,5	3,0	3,0	3,3
20	2	30	6,5	16,5	62,0	61,5
21	2	25	6,5	30,0	1,8	2,5

“Tabla A2. Continuación”

Corrida	Réplica	Variables			Rendimiento HMFCa (%)	
		A	B	C	Experimental	Predicho
22	2	35	6,5	30,0	1,7	1,1
23	1	25	5,0	16,5	9,0	7,9
24	1	35	8,0	16,5	3,0	3,3
25	2	25	5,0	16,5	3,1	2,5
26	2	30	5,0	30,0	62,0	63,1
27	2	35	6,5	3,0	3,3	2,5
28	2	30	6,5	16,5	9,2	5,3
29	2	30	8,0	30,0	56,2	56,2
30	2	35	8,0	16,5	57,1	55,1

Tabla A3. Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	18363.1	2040.3	602.54	0.000
Lineal	3	13023.2	4341.1	1281.97	0.000
Temperatura	1	57.0	57.0	16.83	0.001
pH	1	32.8	32.8	9.68	0.006
Concentración	1	12933.4	12933.4	3819.40	0.000
Cuadrado	3	5280.2	1760.1	519.77	0.000
Temperatura*Temperatura	1	10.8	10.8	3.18	0.090
pH*pH	1	15.4	15.4	4.56	0.045
Concentración*Concentración	1	5272.6	5272.6	1557.08	0.000
Interacción de 2 factores	3	59.7	19.9	5.88	0.005
Temperatura*pH	1	2.8	2.8	0.82	0.377
Temperatura*Concentración	1	5.0	5.0	1.47	0.240
pH*Concentración	1	52.0	52.0	15.36	0.001
Error	20	67.7	3.4		
Falta de ajuste	3	2.9	1.0	0.25	0.860
Error puro	17	64.9	3.8	-	-
Total	29	18430.8	-	-	-

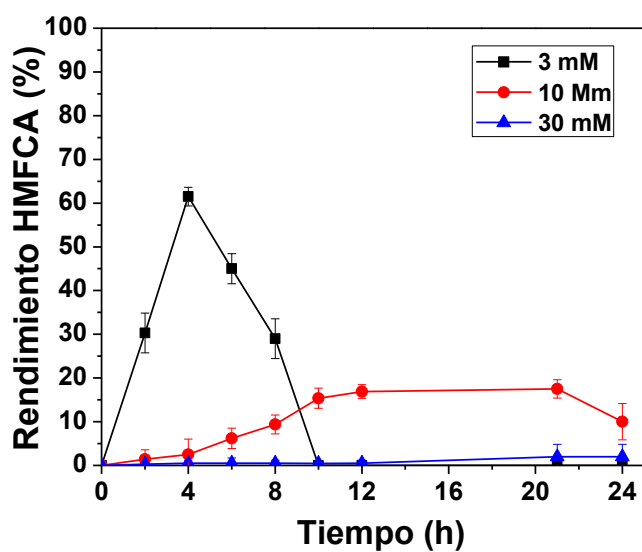


Figura A1. Efecto de la concentración de 5-HMFf en la síntesis de HMFCa. Condiciones de reacción: D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=6,5, agitación=200 rpm, MMS con 3, 10 y 30 mM de 5-HMF.

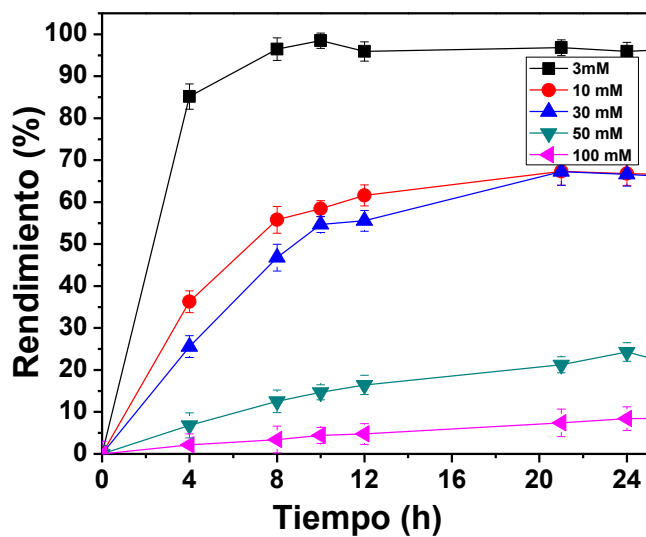


Figura A2. Efecto de la concentración de 5-HMFp en la síntesis de HMFCa. Condiciones de reacción: D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=6,5, agitación=200 rpm, MMS con 3, 10, 30, 50 y 100 mM de 5-HMF.

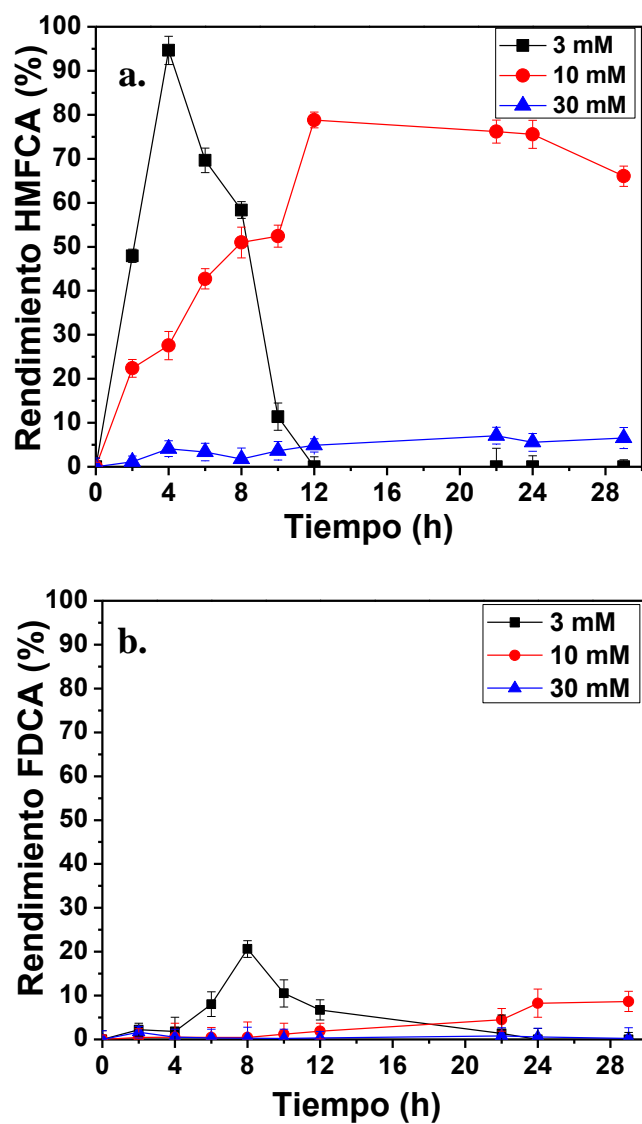


Figura A3. Efecto de la concentración de 5-HMF en la síntesis de a) HMFCa y b) FDCA. Condiciones de reacción: D.O. inicial=0,05, temperatura=30 °C, pH=8, agitación=200 rpm, MMS con 3, 10 y 30 mM de 5-HMF.

7 CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA

7.1 Artículos

- Tatiana Muñoz, Leidy Y. Rache, Hugo A. Rojas, Gustavo P. Romanelli, Rafael Luque, José J. Martínez, “Biocatalytic production of 5-hydroxymethyl-2-furan carboxylic acid (HMFCa) using fructose hydrolysates”. Aceptado para su publicación en la revista *Ciencia en Desarrollo.*, vol. 10, no. 2, 2019.

7.2 Participación en eventos

- X Simposio Colombiano de Catálisis, “*Integración de la catálisis ácida con la biocatálisis para la obtención de moléculas plataforma*”, 25 – 29 de septiembre de 2017, Tunja – Colombia.
- Primer Congreso Internacional de Química Aplicada al Sector Productivo, “*Oxidación selectiva de ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico a partir de 5-hidroximetilfurfural con microorganismos aislados de bagazo de caña*”, 5-7 de septiembre de 2018, Armenia-Colombia.
- III Congreso Colombiano Bioquímica y Biología Molecular, “*Oxidación biocatalítica de 5-hidroximetilfurfural en hidrolizados de fructosa*”, 1-3 de noviembre de 2018, Bogotá-Colombia.

8 REFERENCIAS

- [1] M. Almeida, J., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hagerdal, B., Liden, G., & Gorwa-Grauslund, "Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 82, no. 4, pp. 340–349, 2007.
- [2] S. Subbiah, S. P. Simeonov, J. M. S. S. Esperança, L. P. N. Rebelo, and C. A. M. Afonso, "Direct transformation of 5-hydroxymethylfurfural to the building blocks 2,5-dihydroxymethylfurfural (DHMF) and 5-hydroxymethyl furanoic acid (HMFA) via Cannizzaro reaction," *Green Chem.*, vol. 15, no. 10, p. 2849, 2013.
- [3] Y.-Z. Qin, Y.-M. Li, M.-H. Zong, H. Wu, and N. Li, "Enzyme-catalyzed selective oxidation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and separation of HMF and 2,5-diformylfuran using deep eutectic solvents," *Green Chem.*, vol. 17, no. 7, pp. 3718–3722, 2015.
- [4] F. Wang and Z. Zhang, "Cs-substituted tungstophosphate-supported ruthenium nanoparticles: An effective catalyst for the aerobic oxidation of 5-hydroxymethylfurfural into 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 70, pp. 1–6, 2017.
- [5] M. Munekata and G. Tamura, "Antitumor Activity of 5-Hidroxy-methyl-2-furoic Acid," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 45, no. 9, pp. 40–41, 1981.
- [6] Y. M. Li, X. Y. Zhang, N. Li, P. Xu, W. Y. Lou, and M. H. Zong, "Biocatalytic Reduction of HMF to 2,5-Bis(hydroxymethyl)furan by HMF-Tolerant Whole Cells," *ChemSusChem*, vol. 10, no. 2, p. 304, 2017.
- [7] F. Koopman, N. Wierckx, J. H. de Winde, and H. J. Ruijsenaars, "Efficient whole-cell biotransformation of 5-(hydroxymethyl)furfural into FDCA, 2,5-furandicarboxylic acid," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 16, pp. 6291–6296, 2010.
- [8] R. Trifonova, J. Postma, F. W. A. Verstappen, H. J. Bouwmeester, J. J. M. H. Ketelaars, and J. D. Van Elsas, "Removal of phytotoxic compounds from torrefied grass fibres by plant-beneficial microorganisms," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 66, no. 1, pp. 158–166, 2008.
- [9] M. J. López, J. Moreno, N. N. Nichols, B. S. Dien, and R. J. Bothast, "Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 64, no. 1, pp. 125–131, 2004.
- [10] J. Zhang, Z. Zhu, X. Wang, N. Wang, W. Wang, and J. Bao, "Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 3, no. 1, p. 26, 2010.
- [11] G. S. Hossain *et al.*, "Metabolic engineering of *Raoultella ornithinolytica* BF60 for production of 2,5-furandicarboxylic acid from 5-hydroxymethylfurfural," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 83, no. 1, 2017.
- [12] E. Capuano and V. Fogliano, "Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 4, pp. 793–810, 2011.
- [13] N. Wierckx, F. Koopman, H. J. Ruijsenaars, and J. H. De Winde, "Microbial degradation of furanic compounds: Biochemistry, genetics, and impact," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 92, no. 6, pp. 1095–1105, 2011.
- [14] D. Macías Granados, "Catabolismo de furfurales y compuestos aromáticos en '*Pseudomonas pseudoalcaligenes*' CECT 5344. Aislamiento de nuevas cepas asimiladoras de cianuro y sus complejos metálicos," Universidad de Extremadura, 2014.
- [15] P. W. Trudgill, "The metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas F2*," *Biochem J*, vol. 113, no. 4, pp. 577–587, 1969.
- [16] K. Koenig and J. R. Andreesen, "Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: Two molybdenum-containing

- dehydrogenases of novel structural composition,” *J. Bacteriol.*, vol. 172, no. 10, pp. 5999–6009, 1990.
- [17] F. Koopman, N. Wierckx, J. H. de Winde, and H. J. Ruijsenaars, “Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 11, pp. 4919–4924, 2010.
 - [18] J. M. R. Gallo, D. M. Alonso, M. A. Mellmer, and J. A. Dumesic, “Production and upgrading of 5-hydroxymethylfurfural using heterogeneous catalysts and biomass-derived solvents,” *Green Chem.*, vol. 15, no. 1, pp. 85–90, 2013.
 - [19] I. A. Vanegas, “Síntesis y reactividad de 5-hidroximetilfurfural (HMF),” Universidad Nacional Autónoma de México., 2014.
 - [20] C. C. Vanegas Salazar, “Manejo Del Bagazo En La Agroindustria De La Caña Panelera En El Nordeste Antioqueño a Partir De La Gestión Integral De Residuos: Estudio De Caso Municipio De Yolombo,” Universidad de Manizales, 2016.
 - [21] M. Ventura, M. Aresta, and A. Dibenedetto, “Selective Aerobic Oxidation of 5-(Hydroxymethyl)furfural to 5-Formyl-2-furancarboxylic Acid in Water,” *ChemSusChem*, vol. 9, no. 10, pp. 1096–1100, 2016.
 - [22] O. Casanova, S. Iborra, and A. Corma, “Chemicals from biomass: Etherification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) into 5,5’-(oxy-bis(methylene))bis-2-furfural (OBMF) with solid catalysts,” *J. Catal.*, vol. 275, no. 2, pp. 236–242, 2010.
 - [23] R. Rinaldi, R. Palkovits, and F. Schuth, “Depolymerization of cellulose using solid catalysts in ionic liquids,” *Angew. Chemie, Int. Ed.*, vol. 47, no. 42, pp. 8047–8050, 2008.
 - [24] E. F. Dunn, D. Liu, and E. Y. X. Chen, “Role of N-heterocyclic carbenes in glucose conversion into HMF by Cr catalysts in ionic liquids,” *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 460–461, pp. 1–7, 2013.
 - [25] A. Corma Canos, S. Iborra, and A. Veltz, “Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals,” *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 6, pp. 2411–2502, 2007.
 - [26] G. Rothenberg, *Catalysis : Concepts and Green Applications*. 2015.
 - [27] S. P. Teong, G. Yi, and Y. Zhang, “Hydroxymethylfurfural production from bioresources: past, present and future,” *Green Chem.*, vol. 16, no. 4, p. 2015, 2014.
 - [28] C. Idler, J. Venus, and B. Kamm, *Microorganisms In Biorefineries*. 2015.
 - [29] W. P. Dijkman, D. E. Groothuis, and M. W. Fraaije, “Enzyme-catalyzed oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to furan-2,5-dicarboxylic acid,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 25, pp. 6515–6518, 2014.
 - [30] W. P. Dijkman and M. W. Fraaije, “Discovery and characterization of a 5-hydroxymethylfurfural oxidase from *Methylovorus* sp. strain MP688,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 3, pp. 1082–1090, 2014.
 - [31] M. A. Lee J, Lee S, Park S, “Research review paper Control of fed-batch fermentations,” *Biotechnol. Adv.*, p. pp: 29-48, 1999.
 - [32] M. L. Shuler and F. Kargi, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, Second Edition. Prentice hall, 2002.
 - [33] E. Hernández, “Cultivo continuo de microorganismos,” *Rev. la Fac. Agron.*, vol. 2, pp. 95–112, 1974.
 - [34] Z. Sun, J. A. Ramsay, M. Guay, and B. A. Ramsay, “Fed-batch production of unsaturated medium-chain-length polyhydroxyalkanoates with controlled composition by *Pseudomonas putida* KT2440,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 82, no. 4, pp. 657–662, 2009.
 - [35] S. Y. Lee, “High cell-density culture of *Escherichia coli*,” *Trends Biotechnol.*, vol. 14, no. 3, pp. 98–105, 1996.
 - [36] Y. Y. Gorbaney, S. K. Klitgaard, J. M. Woodley, C. H. Christensen, and A. Riisager, “Gold-

- catalyzed aerobic oxidation of 5-hydroxymethylfurfural in water at ambient temperature,” *ChemSusChem*, vol. 2, no. 7, pp. 672–675, 2009.
- [37] E. S. Kang, D. W. Chae, B. Kim, and Y. G. Kim, “Efficient preparation of DHMF and HMFA from biomass-derived hmf via a cannizzaro reaction in ionic liquids,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 18, no. 1, pp. 174–177, 2012.
 - [38] P. Verdeguer, N. Merat, and A. Gaset, “Oxydation catalytique du HMF en acide 2,5-furane dicarboxylique,” *J. Mol. Catal.*, vol. 85, no. 3, pp. 327–344, 1993.
 - [39] A. Lolli *et al.*, “Insights into the reaction mechanism for 5-hydroxymethylfurfural oxidation to FDCA on bimetallic Pd-Au nanoparticles,” *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 504, pp. 408–419, 2015.
 - [40] S. E. Davis, L. R. Houk, E. C. Tamargo, A. K. Datye, and R. J. Davis, “Oxidation of 5-hydroxymethylfurfural over supported Pt, Pd and Au catalysts,” *Catal. Today*, vol. 160, no. 1, pp. 55–60, 2011.
 - [41] Z. Miao *et al.*, “Superior catalytic performance of $\text{Ce}_{1-x}\text{Bi}_x\text{O}_{2-\delta}$ solid solution and $\text{Au/Ce}_{1-x}\text{Bi}_x\text{O}_{2-\delta}$ for 5-hydroxymethylfurfural conversion in alkaline aqueous solution,” *Catal. Sci. Technol.*, vol. 5, no. 2, pp. 1314–1322, 2015.
 - [42] T. Pasini *et al.*, “Selective oxidation of 5-hydroxymethyl-2-furfural using supported gold-copper nanoparticles,” *Green Chem.*, vol. 13, no. 8, pp. 2091–2099, 2011.
 - [43] Z. Zhang, B. Liu, K. Lv, J. Sun, and K. Deng, “Aerobic oxidation of biomass derived 5-hydroxymethylfurfural into 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid catalyzed by a montmorillonite K-10 clay immobilized molybdenum acetylacetonate complex,” *Green Chem.*, vol. 16, no. 5, p. 2762, 2014.
 - [44] N. K. Gupta *et al.*, “Hydrotalcite-supported gold-nanoparticle-catalyzed highly efficient base-free aqueous oxidation of 5-hydroxymethylfurfural into 2,5-furandicarboxylic acid under atmospheric oxygen pressure,” *Green Chem.*, vol. 13, no. 4, p. 824, 2011.
 - [45] K. Mitsukura, Y. Sato, T. Yoshida, and T. Nagasawa, “Oxidation of heterocyclic and aromatic aldehydes to the corresponding carboxylic acids by *Acetobacter* and *Serratia* strains,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 26, no. 21, pp. 1643–1648, 2004.
 - [46] X.-Y. Zhang, M.-H. Zong, and N. Li, “Whole-cell biocatalytic selective oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid,” *Green Chem.*, vol. 19, no. 19, pp. 4544–4551, 2017.
 - [47] M. van Deurzen, F. van Rantwijk, and R. Sheldon, “Chloroperoxidase-Catalyzed Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural,” *J. Carbohydr. Chem.*, no. July 2013, pp. 37–41, 2006.
 - [48] M. J. Taherzadeh, L. Gustafsson, C. Niklasson, and G. Lidén, “Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 53, no. 6, pp. 701–708, 2000.
 - [49] N. Terasawa, A. Sugiyama, M. Murata, and S. Homma, “Isolation of a microorganism to oxidize 5-hydroxymethylfurfural,” *Food Sci. Technol. Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 28–31, 2002.
 - [50] H. Ran, J. Zhang, Q. Gao, Z. Lin, and J. Bao, “Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, no. 1, p. 51, 2014.
 - [51] C. F. Yang and C. R. Huang, “Biotransformation of 5-hydroxy-methylfurfural into 2,5-furandicarboxylic acid by bacterial isolate using thermal acid algal hydrolysate,” *Bioresour. Technol.*, vol. 214, pp. 311–318, 2016.
 - [52] N. Wierckx, F. Koopman, L. Bandounas, J. H. De Winde, and H. J. Ruijsenaars, “Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 3, no. 3, pp. 336–343, May 2010.
 - [53] A. C. Moreno, “Identificación molecular de una especie de *Serratia* aislada de musa

- paradisiaca,” Universidad Veracruzana, 2010.
- [54] M. T. Rokade and A. S. Pethe, “Isolation , Identification and Optimization Study of Prodigiosin from *Serratia marcescens*,” *Biosci. Discov.*, vol. 8, no. 3, pp. 388–396, 2017.
 - [55] J. J. Martínez *et al.*, “Dehydration of Glucose to 5-Hydroxymethylfurfural Using LaOCl/Nb₂O₅ Catalysts in Hot Compressed Water Conditions,” *Catal. Letters*, vol. 147, no. 7, pp. 1765–1774, 2017.
 - [56] N. Aslan and Y. Cebeci, “Application of Box-Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals,” *Fuel*, vol. 86, no. 1–2, pp. 90–97, 2007.
 - [57] J. Harvill, “MINITAB statistical software, release 7.2 SUN-4 version,” *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 18, no. 1, pp. 111–112, 1993.
 - [58] “Primer3,” 2012. [Online]. Available: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.
 - [59] P. Y. Nikolov and V. A. Yaylayan, “Thermal decomposition of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) and its further transformations in the presence of glycine,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 18, pp. 10104–10113, 2011.
 - [60] N. M. Elkenawy, A. S. Yassin, H. N. Elhifnawy, and M. A. Amin, “Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* using crude glycerol and enhancing production using gamma radiation,” *Biotechnol. Reports*, vol. 14, pp. 47–53, 2017.
 - [61] W. T. Su, T. Y. Tsou, and H. L. Liu, “Response surface optimization of microbial prodigiosin production from *Serratia marcescens*,” *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 42, no. 2, pp. 217–222, 2011.
 - [62] S. O. Dozie-Nwachukwu, Y. Danyuo, J. D. Obayemi, O. S. Odusanya, K. Malatesta, and W. O. Soboyejo, “Extraction and encapsulation of prodigiosin in chitosan microspheres for targeted drug delivery,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 71, pp. 268–278, 2017.
 - [63] C. Z. Zang *et al.*, “Identification and enhanced production of prodigiosin isoform pigment from *Serratia marcescens* N10612,” *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 45, no. 4, pp. 1133–1139, 2014.
 - [64] I. N. Ryazantseva, V. S. Saakov, I. N. Andreyeva, T. I. Ogorodnikova, and Y. F. Zuev, “Response of pigmented *Serratia marcescens* to the illumination,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 106, no. 1, pp. 18–23, 2012.
 - [65] A. Narang and S. S. Pilyugin, “Bacterial gene regulation in diauxic and non-diauxic growth,” *J. Theor. Biol.*, vol. 244, no. 2, pp. 326–348, 2007.
 - [66] F. Martínez Montes and H. Pardo Vázquez, Juan Pablo Riveros Rosas, *Bioquímica de Laguna y Piña*, Octava Edi. Ciudad de México: Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., 2018.
 - [67] E. Palmqvist and B. Hahn-Hägerdal, “Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition,” *Bioresour. Technol.*, vol. 74, no. 1, pp. 25–33, 2000.
 - [68] G. Sakir Hossain *et al.*, “Metabolic engineering of *Raoultella ornithinolytica* BF60 for the production of 2, 5- furandicarboxylic acid from 5-hydroxymethylfurfural Running Title: 2, 5-furandicarboxylic acid production,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016.
 - [69] A. Khanafari, M. M. Assadi, and F. A. Fakhr, “Review of Prodigiosin , Pigmentation in *Serratia marcescens*,” *J. Biol. Sci.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, 2006.
 - [70] H. W. C. De Araújo, K. Fukushima, and G. M. C. Takaki, “Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate,” *Molecules*, vol. 15, no. 10, pp. 6931–6940, 2010.
 - [71] S. L. C. Ferreira *et al.*, “Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 597, no. 2, pp. 179–186, 2007.
 - [72] C. Chang, P. Cen, and X. Ma, “Levulinic acid production from wheat straw,” *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 7, pp. 1448–1453, 2007.
 - [73] Y. Kwak, A. R. Khan, and J. H. Shin, “Genome sequence of *Serratia nematodiphila* DSM 21420T, a symbiotic bacterium from entomopathogenic nematode,” *J. Biotechnol.*, vol. 193,

- pp. 1–2, 2015.
- [74] P. Li *et al.*, “Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential,” *PLoS One*, vol. 10, no. 4, pp. 1–22, 2015.
 - [75] A. Iguchi *et al.*, “Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen,” *Genome Biol. Evol.*, vol. 6, no. 8, pp. 2096–2110, 2014.
 - [76] S. S. Pao, I. an T. Paulsen, and M. H. Saier, “Major Facilitator Superfamily,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 1, pp. 1–34, 1998.
 - [77] C. M. Grant, F. H. Maciver, and I. W. Dawes, “Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Curr. Genet.*, vol. 29, pp. 511–515, 1996.
 - [78] C. Wang, S. R. Wesener, H. Zhang, and Y. Q. Cheng, “An FAD-Dependent Pyridine Nucleotide-Disulfide Oxidoreductase Is Involved in Disulfide Bond Formation in FK228 Anticancer Depsipeptide,” *Chem. Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 585–593, 2009.
 - [79] C. H. Williams, “Mechanism from and structure of thioredoxin reductase *Escherichia coli*,” *FASEB J.*, vol. 9, pp. 1267–1276, 1995.
 - [80] A. G. Sánchez Fuentes and R. Arredondo Peter, “La dihidrolipoamida deshidrogenasa: estructura, función y patología,” *Rev. Educ. Bioquímica*, vol. 36, no. 3, pp. 82–88, 2017.
 - [81] D. Kim and J. S. Hahn, “Roles of the Yap1 transcription factor and antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*’s tolerance to furfural and 5-Hydroxymethylfurfural, which function as Thiol-Reactive electrophiles generating oxidative stress,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 16, pp. 5069–5077, 2013.
 - [82] M. Deponte, “Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, no. 5, pp. 3217–3266, 2013.
 - [83] B. Favaloro, S. Melino, R. Petruzzelli, C. Di Ilio, and D. Rotilio, “Purification and characterization of a novel glutathione transferase from *Ochrobactrum anthropi*,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 160, no. 1, pp. 81–86, 1998.
 - [84] J. R. Mahan and J. J. Burke, “Purification and characterization of glutathione reductase from corn *Mesophyll chloroplasts*,” *Physiol. Plant.*, vol. 71, no. 3, pp. 352–358, 1987.
 - [85] Y. Wang, H. Han, B. Cui, Y. Hou, Y. Wang, and Q. Wang, “A glutathione peroxidase from *Antarctic psychrotrophic* bacterium *Pseudoalteromonas sp.* ANT506: Cloning and heterologous expression of the gene and characterization of recombinant enzyme,” *Bioengineered*, vol. 8, no. 6, pp. 742–749, 2017.
 - [86] R. Jaenicke, H. D. Lüdemann, and G. Schmid, “Pressure, Temperature and pH Dependence of the Absorption Spectrum of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide,” *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 36, no. 1–2, pp. 84–86, 1981.
 - [87] T. Dalglish *et al.*, *Dehydrogenases Requiring Nicotinamide Coenzymes*, vol. 136, no. 1, 2007.
 - [88] M. Ask, V. Mapelli, H. Höck, L. Olsson, and M. Bettiga, “Engineering glutathione biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* increases robustness to inhibitors in pretreated lignocellulosic materials,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–10, 2013.
 - [89] C. F. Yang and C. R. Huang, “Isolation of 5-hydroxymethylfurfural biotransforming bacteria to produce 2,5-furan dicarboxylic acid in algal acid hydrolysate,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 125, no. 4, pp. 407–412, 2018.